République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Option: Normes et contrôle de qualité

Dépistage des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache et les produits laitiers

Présenté par :

Chikh Touami Sarah

Bensedgua Soumia

Proposé et dirigé par :

Dr. Zouambia.Y (Promotrice)

Promotion 2014-2015

REMERCIEMENTS

On remercie premièrement ALLAH le tout puissant pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage, sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

Nos vifs remerciements vont a notre promotrice de mémoire, Dr:Zouambia Yamina qui a bien voulu accepter l'encadrement de notre travail pour ses précieuses orientations et ses valeureux conseils. Merci pour votre disponibilité.

On tient également à remercier tous les personnel du l'Unité de Microbiologique des laboratoires (Hall technologique de l'université de Médéa, laboratoire microbiologique au niveau du complexe antibiotical Saidal et le laboratoire de microbiologie de la direction de la santé publique) ainsi que tous ceux qui ont participé en répondant à nos questions et en mettant à notre disposition les informations et les documents nécessaires à la réalisation de ce travail. Merci pour votre aide précieuse.

Nos remerciements vont aussi à tous les membres du jury qui ont accepté de jugé ce travail et à tous les enseignants.

On remercie tous ceux qui ont participé de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A ma très chère Mère Rabia.

Affable, aimable : tu représente pour moi le symbole de la beauté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement par ta prière et ta bénédiction qui m'ont toujours été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de donner ma vie durant. Tu a fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie pleine de bonheur.

A mon père Mohamed :

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi mon cher père. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Au fleurs qui embellissent mon existence : grand père et grand-mère que Dieu prolonge leurs vies.

A mon adorable turbulente petite sœur Ikram qui illumine ma vie avec ses discussions interminables.

Au petit ange Nesrine, joyau joyeux de notre maison.

A Louai et Yassine. A Sarah qui m'a partagé la galère et la peine de mener à bien ce travail.

A mes amies : Amina, Souad, Fatiha, Zhor et Wafa.

A tous ce que je connais, et qui m'ont appris à sourire et partagé avec moi le moindre petit souvenir.

Je dédie ce modeste travail. *Soumia*

Dédicaces

Merci Allah (mon Dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patient ce d'aller jusqu'au bout.

Je dédie ce modeste travail :

A celle qui m'a donné la vie, a la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A mon père, A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, l'école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

A mes sœurs Amel, Halla et ma petite sœur Hakima : mes belle fleurs que j'aime si fort,

A mon frère Hichem à qui je souhaite un bel avenir.

A mes nièces Lina, et la dorlotée Wafaa ainsi qu'à mes neveux Rafik, Nadji et au petit poussin Wassim.

Je leur souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité, je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A ma grand-mère chérie, à qui je souhaite un prompt rétablissement.

A mes amies: Ihsen, Hassiba, Khadîdja ,Soumia,Sihem,Selma,,Amina: en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréable que nous avons passés ensemble.

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A toute la promotion 2015

Sarah

Abréviation :

FAO : **F**ood and **A**griculture **O**rganization of the United Nation

UFC : Unité Formant Colonie

CVMP : Committee for Veterinary Medicinal Products

DJA : Dose Journalière Admissible (ou Autorisée)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

LMR : Limite Maximale de Résidus

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

PPP: produits phytopharmaceutiques

BPA : Bonne Pratique Agricole

fièvre Q : est une maladie causée par la bactérie *Coxiella burnetii* .

KJ : kilojoules

Kcal : Kilocalories

Mg : Milligramme

g : Gramme

Ca : Calcium

P : Phosphore

CEE : Communauté économique européenne

UI : Unité internationale

ml : Millilitre

µg : Microgramme

kg : Kilogramme

ppm : Partie par million

Liste des figures

Figure I.1 : Instrumentation de l'HPLC ……..……31
Figure I.2 : Etapes du Chromatographie sur couche mince ……...…….33
Figure II.1 : Différentes étapes de prélèvement du lait cru ……...37
Figure II.2 : Mesure du pH lait …….……..38
Figure II.3 : Détermination de la densité par pesée ……39
Figure II.4 : Différentes étapes pour détermination de la teneur en lactose par la méthode de Bertrand …….…….41
Figure II.5: Réalisation du test de formol ……..43
Figure II.6 : Différentes étapes du test FAMT ……..44
Figure II.7: Différents échantillons des produits laitiers analysés ……44
Figure II.8 : Appareil du comptage des colonies après incubation ……...…45
Figure II.9 : Différentes étapes de la diffusion sur gélose ……49
Figure II.10 : Déférentes étapes réalisées pour HPLC……52
Figure III.1 : Résultats du test formol…….57
Figure III.2 : Résultats du contrôle de la sensibilité des souches ……..63
Figure III.3 : Résultat globale des quarante échantillons de laits cru…….63
Figure III.4 : Résultats des échantillons positifs du lait ……....65
Figure III.5 : Résultats des échantillons positifs et négatifs par région ……66
Figure III.6 : Résultats des échantillons positifs et négatifs pour le beurre et le yaourt ……...67
Figure III.7 : Résultats des zones d'inhibitions des échantillons positifs …….68
Figure III.8 : Résultats du Chromatographie des standards des antibiotiques utilisés...72
Figure III.9 : Chromatogrammes des échantillons du lait testés……....75

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Composition moyenne du lait de vache ……..……....4
Tableau I.2 : Caractéristiques physicochimiques du lait de vache ……..9
Tableau I. 3 : Flore originelle du lait cru ……..…….10
Tableau I.4 : Germes contaminant le lait cru ……..……11
Tableau I. 5 : Sources et niveaux de contamination du lait …...……12
Tableau 6 : Quantités disponibles de lait et de produits laitiers (beurre exclu), par pays ……...…….....15
Tableau I.7 : Limite Maximale des Résidus (LMR) des principaux antibiotiques (exprimées en µg/kg ou ppm) ……...……..……24
Tableau I.8 : Evolution des méthodes de détection dans de temps ……28
Tableau II.1 : Matériel et produits utilisés ……..…….34
Tableau III.1 : Valeurs du pH des échantillons du lait cru……..…….53
Tableau III.2: Valeurs de l'acidité Dornic de lait cru …….….. 54
Tableau III.3 : Densité de lait cru ……..…….....55
Tableau III.4 : Valeurs de l'extrait sec du lait cru……..55
Tableau III.5 : Teneurs en lactose du lait cru…….....56
Tableau III.6: Résultats du test de formol du lait cru…….57
Tableau III.7: Résultats du FAMT des échantillons du lait cru…….....58
Tableau III.8 : Résultats de FAMT du yaourt…….59
Tableau III.9 : Résultats du FAMT du beurre…….....60
Tableau III.10 : Familles d'antibiotiques détectées par les bactéries étudiées…….....61
Tableau III.11: Références pour la lecture de l'antibiogramme…….....61
Tableau III.12: Résultats positifs des échantillons de lait pour chaque bactérie…...63
Tableau III.13: Distribution des résultats selon chaque région ……65
Tableau III.14: Répartition des échantillons de lait cru par rapport aux antibiotiques dépistés ……67
Tableau III.15: les valeurs des paramètres des pics obtenus à partir des trois standards d'antibiotiques utilisés …….……70
Tableau III.16: Données des chromatographie de échantillons du lait testés……..72

ملخص

تهدف هذه الدراسة للبحث عن بقايا المضادات الحيوية في الحليب الخام وبعض منتجات الألبان المباعة في ولاية المدية حيث تم جمع 40 عينة من الحليب الخام من أربع مناطق مختلفة من الولاية ,تم تحليل هذه العينات للكشف عن خصائصها الكيمائية و الفيزيائية والميكروبيولوجية. كشف تحليل 40 عينة من الحليب على المجموعات الميكروبية TMAF أن 95٪ من العينات تحتوي على درجة التلوث الميكروبيولوجي (ما بين $1,22.10^6$ و $2,50.10^8$ UFC/ml) تفوق النسبة المحددة للتلوث فالحليب الخام 10^6 UFC/ml .

كما كشف تحليل البحث عن المضادات الحيوية أن 22,5% من حليب البقر ملوثة بمخلفات المضادات الحيوية و 30% من عينات زبدة البقر ملوثة بمخلفات المضادات الحيوية,و 30% من عينات الياغورت ملوثة بمخلفات المضادات الحيوية. الطريقة التحليلية HPLC أكدت إيجابية عينات الحليب المختبرة.

كلمات المفتاح:حليب خام,بقايا المضادات الحيوية, فحص , التحليل الميكروبيولوجي

Résumé

La présente étude a eu pour objectif la recherche de résidus d'antibiotiques dans le lait cru et quelques produits laitiers vendus dans la wilaya de Médéa. Au total, 40 échantillons de lait ont été collectés sur quatre régions de la wilaya. Ces derniers ont été analysés pour leurs paramètres physicochimiques et microbiologiques. L'énumération de FAMT pour les 40 échantillons de lait cru a montré que 95% des échantillons analysés, ont une flore totale (entre 1.22 10^6 et 2.5 10^8 UFC/ml) dépassant la norme fixée à 10^6UFC/ml.Le dépistage des résidus d'antibiotiques réalisé par la diffusion en gélose a montré une contamination de 22.5 % des laits testés, de 30% du beurre de vache et de 30% du yaourt. La méthode analytique HPLC a confirmé la positivité des échantillons des laits testés.

Mots clés : Lait cru, Résidus d'antibiotique, Dépistage, Méthode microbiologique.

Abstract

This studyhas aimedthe search forantibiotic residuesin raw milkand somedairyproducts sold in theprovince of Medea. A total of 40milk sampleswere collected fromfour regionsof the province. The latter have been analyzed for their physicochemical and microbiological parameters. The enumeration of FAMT for the 40 raw milk samples showed that 95% of the samples, have a total flora (between 1.22 $10^6$and 2.5$10^8$ CFU/ml) exceeding the standard set in 10^6UFC/ml. The screening of antibiotic residues carried out by the agar diffusion showed contamination of 22.5% of tested milks, 30% of butter and 30% of yogurt. Theanalytical methodHPLCconfirmed thepositivesamplestested of the milks.

Keywords: Raw Milk, Antibiotic residues, Screening, Microbiology analysis.

Introduction générale

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de 3 milliards de litres par an. Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, il apporte la plus grande part de protéines d'origine animale. Acteur clé de l'industrie agroalimentaire, la filière Lait connaît une croissance annuelle de 8%.

Produit vivant et fragile, le lait doit répondre à des normes drastiques, afin d'assurer une qualité irréprochable tant sur le plan microbiologique que toxicologique. Un lait destiné à la consommation humaine se doit par conséquent d'être exempt de tout type de contamination et tout particulièrement médicamenteuse. Malheureusement, l'usage croissant et souvent irraisonné de produits antibiotiques se solde très souvent par la présence de leurs résidus dans le lait produit par la vache traitée.

Les antibiotiques sont utilisés comme outil thérapeutique ou aussi comme facteur de croissance dans l'élevage des animaux. Leur utilisation est limitée par une liste positive pour éviter tous risques pour l'animal et l'homme. Cela n'empêche pas que des résidus d'antibiotiques peuvent se présenter dans le produit animal final consommé par l'homme et être une source de nuisance pour sa santé provoquant des allergies ou des effets de toxicité.

Nous constatons actuellement en Algérie une utilisation abusive et anarchique des antibiotiques en pratique vétérinaire. Il s'agit surtout du non respect du délai d'attente et de l'absence de règlementation concernant les limites maximales autorisées des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale destinées à la consommation humaine.

La détection des résidus d'antibiotiques est d'un grand intérêt. Elle permet de protéger l'homme contre les effets de ces résidus. De nombreuses méthodes permettent la détection et, dans certains cas, l'identification précise des molécules antibiotiques présentes dans le lait. Elles diffèrent par leur sensibilité, leur cout et les difficultés techniques inhérentes à leur réalisation. Certaines comme l'HPLC (High Performance Liquid Chromatrography) ou la LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) permettent outre une identification précise de la molécule en cause, une quantification fine de celle-ci. D'autres méthodes microbiologiques essentiellement basées sur le ralentissement ou l'inhibition de la croissance d'une souche bactérienne sensible mise en présence de l'échantillon de lait à tester ont permis le développement de kits rapides de détection (Delvotest®, Copan Test®, CharmFarm Test®…) plus adaptés au contrôle laitier de masse.

C’est dans ce contexte que s’inscrit la présente étude dont l’objectif principale est la recherche de résidus d’antibiotiques dans le lait cru et quelques produits laitiers (Beurre et yaourt) vendus sur le marché de la wilaya de Médéa. Pour atteindre de telles finalités, des méthodes de dépistage microbiologique (diffusion sur gélose) et analytique (HPLC) ont été utilisées.

Dans la première partie nous avons réuni des données bibliographiques concernant le lait cru, les problèmes causés par les résidus d’antibiotiques, les méthodes de détection couramment utilisées pour leur recherche ainsi que des rappels sur la chromatographie liquide haute performance.

Dans la deuxième partie nous avons groupé tous les résultats relatifs à la caractérisation physicochimique de 40 échantillons de lait cru prélevés de quatre différentes régions de la wilaya de Médéa et au dépistage des résidus d’antibiotiques au niveau de ces 40 échantillons du lai ainsi qu’au niveau de quelques produits laitiers (beurre de vache et yaourt).

Enfin cette étude se termine par une conclusion générale ainsi que les perspectives.

I.1.Le lait

I.1.1.Définition

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum» **[1]**.

Le lait est définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur **[2]**.

Le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes **[3]**.

En général, le lait est un liquide alimentaire opaque, blanc mat légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à odeur peu marquée au gout douceâtre, sécrété, après parturition, par la glande mammaire des animaux mammifères femelles pour nourrir leur nouveau-né **[4].**

I.1.2. Composition du lait

Le lait de vache est un lait caséineux. Sa composition générale est représentée dans le Tableau I.1. Les données sont des approximations quantitatives, qui varient en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation et état de santé de l'animal, période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite. Il reste que la composition exacte d'un échantillon de lait ne peut s'obtenir que par analyse **[5]**.

I.1.2.1.L'eau

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910 g par litre. En elle, sont dispersés tous les autres constituants du lait, tous ceux de la matière sèche **[6]**.

Tableau I.1. Composition moyenne du lait de vache **[7].**

	Composition (g/L)	**Etat physique des composants**
Eau	905	Eau libre (solvant) plus eau liée (3,7%)
Glucides (lactose)	49	Solution
Lipides Matière grasse proprement dite Lécithine (phospholipides) Insaponifiable (stérols, carotènes, tocophérol)	35 34 0,5 0,5	Emulsion des globules gras (3 à 5 μm)
Protides Caséine Protéines solubles (globulines, albumines) Substances azotées non protéiques	34 27 2,5 1,5	Suspension micellaire phosphocaséinate de calcium (0,08 à 0,12 μm) Solution (colloïdale) Solution (vraie)
Sels De l'acide citrique (en acide) De l'acide phosphorique (P2O3) Du chlorure de sodium (NaCl)	 9 2 2 ,6	Solution ou état colloïdale
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	 Traces	
Extrait sec total **Extrait sec non gras**	127 92	

I.1.2.2. Matière grasse

La matière grasse ou taux butyreux représente 25 à 45 g par litre. Elle est constituée par 98,5% de glycérides (esters d'acide gras et de glycérol), 1% de phospholipides polaires et 0,5% de substances liposolubles cholestérol, hydrocarbures et vitamines A, D, E, et K .

La matière grasse est dispersée en émulsion, sous forme de microgouttelettes de triglycérides entourées d'une membrane complexe, dans la phase dispersante qu'est le lait écrémé (B. Cet état globulaire est fragile ; toute altération de la membrane par voie chimique, physique et microbienne conduit à la déstabilisation de l'émulsion. Cette évolution peut être accidentelle, elle se traduit alors le plus souvent par une séparation de la phase grasse sous forme d'huile ou d'agrégats et/ou par l'apparition de flaveurs indésirables (rancidité-oxydation) ; lorsqu'elle est dirigée, elle permet la concentration de la phase grasse sous forme de beurre après barattage, ou sous forme d'huile de beurre et de matière grasse laitière anhydre après chauffage et centrifugation **[8].**

I.1.2.3. Matière azotée

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait **[9].**

Les protéines se répartissent en deux phases : une phase micellaire et une phase soluble. La phase micellaire représente la caséine totale (environ 80% des protéines du lait). Elle est formée par quatre protéines individuelles:

- Alpha-caséines ou caséines αs_1 36 % et αs_2 10 % ;
- Bêta-caséine ou caséine β 34 % ;
- Kappa-caséine ou caséine κ 13 % ;
- Gamma-caséines ou caséine γ 7 % (produits de la protéolyse de la β-caséine)**[10].**

Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (2,9 % de Ca, 0,1% de Mg, 4,3% d'ion phosphate, 0,5% d'ions citrate) **[11].**La présence de phosphate de calcium lié à la caséine est l'une des forces responsables de la stabilité de la structure des micelles de caséine **[12].**

Une propriété importante des micelles est de pouvoir être déstabilisée par voie acide ou par voie enzymatique et de permettre la coagulation. Elle constitue le fondement de la transformation du lait en fromage et en laits fermentés **[13].**

L'autre fraction protéique (environ 17%) du lait est présente dans le lactosérum. Les deux principales protéines sériques sont la β-lactoglobuline et l'α-lactalbumine **[11]**.

I.1.2.4. Glucides

Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g par litre. C'est un disaccharide constitué par de l'α ou β glucose uni à du β galactose, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactoses **[14]**:

$$\alpha\ Glu + \beta\ Gal \Longrightarrow \alpha\ Lac\ hydraté : C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$$

$$\beta\ Glu + \alpha\ Gal \Longrightarrow \beta\ Lac\ anhydre : C_{12}H_{22}O_{11}$$

Le lactose est fermentescible par de nombreux micro-organismes et il est à l'origine de plusieurs types de fermentations pouvant intervenir dans la fabrication de produits laitiers **[15]** :

- **Fermentation lactique** : due aux bactéries lactiques naturelles ou ajoutées (ferments lactiques) qui utilisent le lactose en le transformant en acide lactique. Cette fermentation lactique est souvent accompagnée d'une production plus au moins grande de substances secondaires (ex. diacétyle) responsables de l'arôme des produits laitiers **[16]**.
- **Fermentation propionique** : due aux bactéries propioniques qui transforment le lactose en acide propionique et en acide acétique responsables de la flaveur des fromages à pâte cuite et en gaz carbonique induisant l'ouverture de ces fromages **[14]**.
- **Fermentation butyrique** : par des bactéries du genre *Clostridium* qui utilisent l'acide lactique déjà produit en le transformant en acide butyrique, responsable d'odeurs putrides et de goût piquant, et en gaz carbonique et hydrogène. Ces substances induisent le gonflement tardif des fromages, en particulier à pâte cuite.
- **Fermentation alcoolique** : due à des levures qui hydrolysent le lactose en glucose et galactose et qui transforment ensuite le glucose en alcool éthylique. Cette fermentation est utilisée en particulier dans la fabrication du kéfir, boisson issue de la fermentation du lait, contenant peu d'alcool et légèrement gazeuse.

A température élevée, le lactose participe avec les protéines à des réactions de brunissement non enzymatique pouvant altérer la couleur des laits stérilisés **[17]**.

I.1.2.5. Matière minérale

La matière minérale du lait (7g à 7,5g/l) est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique. Il est possible de doser les matières minérales ou cendres du lait par une méthode de calcination à 550°C **[14]**.

Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les ions calcium, phosphore, magnésium et soufre existent dans les deux fractions **[6]**. Il existe un équilibre entre les formes solubles et colloïdales, d'une part, et entre les formes ionisées et non dissociées d'autre part. Cet état est précaire parce qu'il est sensible à divers facteurs, notamment au pH, à la température, et à la concentration ou à l'addition de calcium. Toute altération de ces équilibres modifie la stabilité du lait, notamment les propriétés de la caséine native.

En raison de la présence concomitante de lactose et de phosphopeptides (produits d'hydrolyse de la caséine), les minéraux sont, de tous les éléments du lait, ceux qui sont les mieux adsorbés et retenus. A cet égard, le rapport calcium/phosphore (Ca/P) du lait de vache (voisin de 1,2), bien qu'inférieur à celui du lait maternel (voisin de 2,2), est de loin supérieur à celui des autres denrées alimentaires, faisant du lait une excellente source de calcium et un bon correctif des rations pauvres en calcium **[18]**.

I.1.2.6. Biocatalyseurs

I.1.2.6.1. Enzymes

Ce sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Plus de 60 enzymes principales ont pu être isolées du lait ou dont l'activité a été déterminée. La moitié d'entre elles sont des hydrolases **[19, 20]**.

Ces enzymes peuvent jouer un rôle très important en fonction de leurs propriétés :

- ✓ Lyses des constituants originels du lait ayant des conséquences importantes sur le plan technologique et sur les qualités organoleptiques du lait (lipases, protéases). Ainsi, on distingue des protéases originelles du lait ; la plasmine est le composant majoritaire (elle provient du sang et migre via la glande mammaire), et des protéases d'origine microbienne. Le genre *Pseudomonas* et tout particulièrement l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, synthétise des protéases exocellulaires thermostables. Il est également à souligner que dans les laits de mammites, le nombre de cellules somatiques peut être

considérablement accru, le niveau de protéolyse est nettement plus élevé que dans les laits normaux **[21]**.

- ✓ Rôle antibactérien, elles apportent une protection au lait (lactoperoxydase et lysozyme).
- ✓ Indicateurs de qualité hygiénique (certaines enzymes sont produites par des bactéries et des leucocytes), de traitement thermique (phosphatase alcaline, peroxydase, acétyle sterase, sont des enzymes thermosensibles) et d'espèces (test de la xanthine-oxydase pour détecter le lait de vache dans le lait de chèvre) **[20]**.

I.1.2.6.2.Vitamines

Ce sont des molécules complexes de taille plus faible que les protéines, de structure très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes, car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique. On classe les vitamines en deux grandes catégories **[22]**:

- ➢ les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait et
- ➢ les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie.

I.1.3. Caractéristiques physicochimique du lait

Le lait est un liquide légèrement visqueux dont la composition et les caractéristiques physicochimiques varient sensiblement selon les espèces animales et selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation ainsi qu'au cours de la traite **[23]**.

Le lait de vache a une densité moyenne égale à 1,032. C'est un mélange très complexe et très instable, il contient une forte proportion d'eau d'environ 87 % .Sur le plan physique, c'est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses)**[23, 24]**.Son pH est légèrement acide (pH compris entre 6,4 et 6,8 pour le lait de vache),l'acidité du lait augmente avec le temps car le lactose va être dégradé en acide lactique **[23]**.

Le Tableau I.2 récapitule les principales caractéristiques physicochimiques du lait de vache.

Tableau I.2. Caractéristiques physicochimiques du lait de vache **[24]**.

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Densité du lait entier à 20 °C	1,031	1,028 - 1,033
Densité de la matière grasse	-	0,94 - 0,96
pH à 20°C	6,6	6,6 - 6,8
Acidité titrable (°Dornic)	16	15 – 17
Point de congélation (°C)	-	-0,520 - 0,550
Tension superficielle du lait entier à 15 °C (dynes/cm)	50	47 – 53
Viscosité du lait entier à 20 °C (centipoise)	2,2	-
Conductivité électrique à 25°C (siemens) b	45 x $10^{-}4$	40 - 50 x 10-4
Point d'ébullition (°C)	-	100,17- 100,15
Potentiel d'oxydoréduction	0,25 V	(+0,20) - (+0,30)
Point de fusion des graisses (°C)	36	25-24

I.1.4. Microbiologie du lait cru

Le lait contient un nombre variable de cellules; celles-ci correspondent à la fois à des constituants normaux comme les globules blancs, mais également à des éléments d'origine exogène que sont la plupart des microorganismes contaminants.

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique, etc.), des substances aromatiques, de l'acide lactique (responsable de l'acidification en technologie fromagère), diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme.

L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages, mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait. Un lait est considéré comme peu contaminé s'il renferme quelques centaines à quelques milliers de

germes par millilitre, un lait fortement pollué peut en contenir plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions par ml.

Dans cette microflore contaminante, les bactéries conditionnent le plus directement la qualité hygiénique ainsi que l'aptitude à la conservation et à la transformation de la matière première **[8].**

I.1.4.1. Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite) **[25]**.

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles. Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles **[26]**.

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation **[27]** et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production **[28]**. Le Tableau I.3 regroupe les principaux microorganismes originels du lait avec leurs proportions relatives.

Tableau I.3. Flore originelle du lait cru **[26]**

Microorganismes	**Pourcentage (%)**
Micrococcus sp.	30-90
Lactobacillus	10-30
Streptococcus ou Lactococcus	<10
Gram négatif	<10

I.1.4.2. Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire **[26]**.

Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, microcoques, corynébactéries, *Bacillus*, etc.,

par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière (voir Tableau I.4).

Des contaminations d'origine fécale peuvent entrainer la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries coliformes et, éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella, Yersinia.* Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait **[29]** .

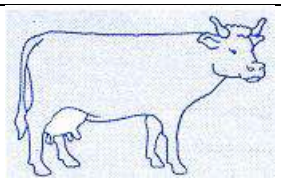
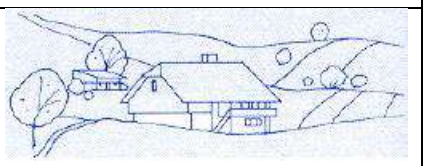
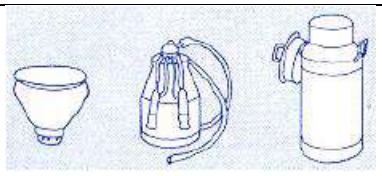
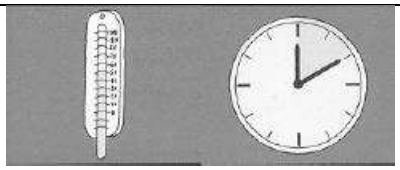
Tableau I.4. Germes contaminant le lait cru **[30]**.

Sources de contamination		**Psychrotrophes**
Germes Gram positifs -Germes sporulés aérobies	Terre, poussière, foin (très répandu)	Certaines espèces
-Germes sporulés anaérobies (clostridies)	Ensilage, fourrage vert en fermentation, boue	Non
-Entérocoques	Fèces, résidus de lait	Non
-Staphylocoques	Peau, muqueuses	Non
-Microcoques	Peau, résidus de lait	Certaines espèces
-Bactéries propioniques	Peau, résidus de lait, fourrage vert en fermentation, ensilage	Non
-Bactéries lactiques	Plantes, ensilages, résidus de lait, muqueuses	Non
-Bactéries corynéformes	Peau, sol	Certaines espèces
Germes Gram négatifs -Colibactéries (*E. coli*)	Féces, eaux usées	Non
-Entérobactéries	Plantes, féces, eaux usées	Certaines espèces
-*Pseudomonas*	Eau, sol (très répandu)	Oui
-*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, etc.	Eau, sol (très répandu)	Oui
Levures	Sol, plantes, résidus de lait (très répandues)	Oui

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : *Streptococcus pyogenes, Corynebactérium pyogenes*, staphylocoques, etc. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella* ; *Brucella*, agent de la fièvre de Malte, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose ; *Mycobacterium bovis* et *tuberculosis*, agents de la tuberculose ; *Bacillus anthracis*, agent du charbon ; *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre coxiellose, et quelques virus.

Hormis les maladies de la mamelle, le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks) (Tableau I.5).

Tableau I.5. Sources et niveaux de contamination du lait **[31]**.

	Normal	**Anormal**	
Pis	<100 germes par milliltre	100 000 et plus par milliltre	
Environnement	1000-5 000 Germes par milliltre	10 000 et plus par milliltre	
Ustensiles à lait	1000-30000 Germes par milliltre	100 000 et plus par milliltre	
Refroidissement et durée de stockage	Pas d'augmentation significative	500 000 et plus par millitre	

I.1.4.3. Flore psychrotrophe

On désigne par psychrotrophes des micro-organismes qui ont la faculté de se développer à une température égale ou inférieure à 7 °C, indépendamment de leur température optimale de croissance (en général, dans le lait, c'est le genre Pseudomonas qui domine). Dans des laits refroidis, cette flore peut devenir la flore dominante, notamment quand ceux-ci ne sont pas récoltés dans d'excellentes conditions hygiéniques et qu'ils sont maintenus plus de 24 à 48 heures dans les conditions habituelles de réfrigération (+3 à +4 °C). Si l'on tient compte de leur temps de génération, la population des psychrotrophes peut être multipliée par 10 en 24 heures à 4 °C et par 4 à 1 °C. Ces germes peuvent produire des lipases et des protéases thermorésistantes ayant pour conséquence l'apparition de goûts très désagréables dans les produits laitiers: goût amer, rance, putride, etc**. [32]**

I.1.5. Valeur nutritive du lait

Le lait est généralement considéré comme un aliment très complet du point de vue nutritionnel car il apporte à la fois des protéines, des glucides, des lipides et des minéraux **[23]**.

I.1.5.1. Apport en protéines

Un litre de lait de vache, qu'il soit entier ou écrémé apporte 35 g de protéines. Il s'agit principalement de caséine, de lactalbumine et de lactoglobuline. Tous les acides aminés indispensables sont présents, ces protéines sont très bien assimilées par l'organisme **[33]**.

I.1.5.2. Apport en lipides

La teneur en lipides du lait de consommation courante est standardisée à un taux minimum de 36 g par litre de lait entier. Cette teneur en lipides confère au lait entier une valeur énergétique importante (700 Kcal soit 2 930 KJ pour 1 litre). Les laits demis écrémé et écrémé apportent respectivement 15 à 18 g et 1 g de lipides par litre.

Les triglycérides du lait comportent essentiellement des acides gras saturés (60 à 65%) et mono-insaturés (32 %). Le lait est pauvre en acides gras essentiels (environ 3%) et comporte 11 à 15 % d'acides gras à chaîne courte ou moyenne (C4 à C12).

Le lait contient également du cholestérol (lait entier : 140 mg/litre, lait 1/2 écrémé : 90mg/litre) **[33]**.

I.1.5.3. Apport en glucides

Le lactose, glucide essentiel du lait, favorise l'absorption du calcium contenu dans cet aliment. Un litre de lait, qu'il soit entier ou écrémé, apporte 50 g de lactose **[33]**.

I.1.5.4. Apports en minéraux et oligo-éléments

Le lait est une source importante de calcium : 1 200 mg par litre (les besoins journaliers de l'adulte sont de 900 mg). Le calcium du lait est mieux absorbé que celui de toute autre source grâce à la présence d'éléments favorables (protéines, graisses et un peu d'acide lactique). Il est mieux utilisé par l'organisme car le lait apporte en même temps du phosphore (rapport Ca/P = 1,4) et de la vitamine D. Le lait apporte en outre du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du zinc et de faibles quantités de soufre, de magnésium et de cuivre. Il ne contient pas de fer **[33, 34].**

I.1.5.5. Apports en vitamines

Le lait entier est une source appréciable en vitamine A, la teneur en vitamine D est variable (plus élevée dans le lait d'été que dans le lait d'hiver). Presque toutes les vitamines du groupe B sont présentes, en particulier la vitamine B12 **[33]**.

I.1.6. Importance de la consommation du lait

Le lait et les produits laitiers participent à la couverture des besoins alimentaires, certains composants peuvent jouer un rôle de promoteur de croissance ou de protecteur à l'égard de maladies notamment **[34].**

- la casoplatéline et la casoplastrine, inhibent l'agrégation plaquettaire ou
- la fixation des fibrinogènes
- les phosphopeptides, chélateurs de calcium, qui expliquaient en partie la forte digestibilité du calcium chez le jeune consommant du lait.
- les casokinines, à rôle immunomodulateur et antihypertenseur
- les casomorphines, à propriétés opioïdes
- les casoxines, antagonistes des opioïdes
- la lactoferrine, glycoprotéine de transport du fer, possède des fonctions antimicrobiennes.

De nombreuses études ont montré que la consommation des produits laitiers pouvait diminuer le risque d'apparition de certains cancers **[34].**

I.1.7. Importance de la consommation du lait dans le monde

La consommation du lait et des produits laitiers n'est connue avec précision que pour les pays développés. Par contre, la FAO dispose pour tous les pays des statistiques des quantités disponibles, par personne et par an, de lait et produits laitiers (le beurre étant exclu) exprimés en équivalent lait, ainsi que la quantité disponible de beurre **[24]** comme le montre le Tableau I.6.

Tableau I.6. Quantités disponibles de lait et de produits laitiers (beurre exclu), par pays (kg/personne/an) **[24].**

Pays	**Quantité disponible**
Quantité supérieure à 243,4 kg/an (soit 666 g/jour)	
Autriche	**251,3**
Finlande	**337,7**
France	**277,7**
Allemagne (nouveaux länder)	**251,8**
Allemagne (ex-RFA)	**243,5**
Islande	**302,2**
Irlande	**323,1**
Pays-Bas	**298,5**
Italie	**261,7**
Norvège	**278,5**
Suède	**324, 7**
Etats-Unis	**247,0**
Quantité comprise entre 182,6 d 243,4 kg/an (soit entre 500 et 666 /jour)	
Australie	**216,6**
Belgique Luxembourg	**207,8**
Bulgarie	**201,3**
Canada	**228,7**
Tchécoslovaquie	**1 96,7**
Danemark	**205,6**
Grèce	**229,4**
Pologne	**234,7**
Somalie	**206,6**

I.1.8. Importance de la consommation laitière en Algérie

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb avec un marché annuel estimé, en 2004, à 1,7 milliard de litres plus de trois milliards de litres en 2007 et une consommation moyenne de l'ordre de 100 à 110 l/habitant/an. Cette consommation augmente encore régulièrement et atteigne au moins 115 l par habitant et par an en 2010.

La production locale est évaluée à un peu moins de deux milliards ,l'Algérie est donc contrainte d'importer des quantités massives de lait, dont la plus grande partie sous forme de lait de poudre qui coûte de plus en plus cher .

En Algérie, le lait occupe une place importante dans la ration alimentaire car il représente la principale source de protéines d'origine animale, en 1990 par exemple, on estime que le lait a compté pour 65,5 % dans la consommation de protéines d'origine animale, devançant largement la viande (22,4 %) et les œufs (12,1 %) et cela est due surtout au coût car un gramme de protéines à partir du lait coûte huit fois moins cher que la même quantité à partir de la viande ; en termes énergétiques, une calorie obtenue à partir de la viande est vingt fois plus chère que celle du lait**[35].**

I.2. Résidus d'antibiotiques dans le lait

L'antibiotique destiné à l'animal est un médicament au même titre que celui destiné à l'homme ; les deux sont soumis à une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) mais le médicament vétérinaire a une exigence supplémentaire ; la fixation d'un temps d'attente. En effet, l'utilisation d'antibiotique pourrait amener à une présence anormale de résidus dans les denrées d'origine animale (Follet, 2007, Oliveira et al, 2006 et Moretain, 2000).

Selon Moretain (2000), Rexach et Petransxiene (1987), les résidus d'antibiotiques dans le lait peuvent causer des problèmes à deux niveaux :

- hygiénique : toxicité des résidus pour le consommateur ;
- technologique : entrave la transformation industrielle du lait **[36].**

I.2.1. Définition des résidus d'antibiotiques

Les résidus sont définis comme étant « tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré » **[37].**

Les résidus sont définis comme toutes substances pharmacologiquement active, qu'il s'agit de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des

animaux après administration des médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux. Il s'agit de traces indésirables de médicaments ou de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci dans le produit final susceptibles de nuire à la santé humaine **[37].**

I.2.2. Origine des résidus

Les antibiotiques et antimicrobiens vétérinaires sont généralement utilisés en élevage à des buts, thérapeutique, prophylactique, métaphylactique et comme additifs alimentaires ou promoteur de croissance **[35].**

I.2.2.1. Utilisation des antibiotiques à titre curatif ou préventif

Au cours de leur vie, les animaux doivent parfois être traités avec des médicaments destinés à prévenir ou à guérir certaines maladies. Il arrive que des résidus de ces médicaments aboutissent dans des produits alimentaires (viande, lait ou œufs, par exemple) provenant d'animaux producteurs d'aliments tels que bovins, ovins, volailles et poissons **[36].**

Les antibiotiques qui représentent la première cause d'inhibiteurs dans le lait et les pics d'antibiotiques sont dus aux traitements par voie intra mammaire plutôt qu'aux traitements par voie générale **[35]**.

I.2.2.2. Utilisation des antibiotiques comme des additifs alimentaires

Les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance afin d'améliorer la productivité des élevages **[35].**

Dans son avis du 28 mai 1999, le comité scientifique directeur de la direction générale de la commission européenne, a déclaré que l'utilisation en tant que facteurs de croissance d'antimicrobiens appartenant aux catégories utilisées en médecine humaine et animale, ou susceptibles de l'être devrait être réduite le plus vite possible et à terme proscrite. Dans un deuxième avis, adopté en mai 2001, ce comité directeur soulignait que ce processus d'élimination devait être planifié et coordonné.

Le règlement n° 1831/2003 du 22/11/2003 de la commission européenne prévoyait la suppression définitive de l'usage des antibiotiques comme additifs en alimentation animale à la fin de l'année 2005 et c'est en 2006 que l'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux était banni dans l'union européenne **[35].**

I.2.2.3.Utilisation en métaphylaxie

Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques (sains ou en incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades. Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie. Elle permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse alors qu'ils sont encore en incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes. La métaphylaxie est généralement mise en œuvre à partir d'un seuil d'atteinte des animaux au sein du lot de 10 à 15 % de l'effectif (par exemple dans un lot de taurillons à l'engrais affectés par une broncho-pneumonie) **[38]**.

I.2.3. Nature des résidus

I.2.3.1. Résidus extractibles

Les résidus extractibles sont défini comme des résidus extraits des tissus ou des liquides biologiques en milieu aqueux acide ou basique, au moyen de solvants organiques et /ou par hydrolyse enzymatique des conjugués. Le procédé d'extraction ne doit pas détruire les substances recherchées **[37].**

I.2.3.2. Résidus non-extractibles

Le résidu non extractible est obtenu en soustrayant le résidu extractible du résidu total et comprend **[37]:**

- les résidus des médicaments incorporés par les voies métaboliques normales dans des composés endogènes (ces résidus ne posent aucun problème toxicologique) ;
- les résidus liés chimiquement, issus de l'interaction des résidus de la substance-mère ou de ses métabolites avec des macromolécules (ces résidus peuvent poser un problème toxicologique).

I.2.4. Propriétés des résidus

I.2.4.1. Notion de biodisponibilités et biodisponibilités de relais

Le résidu biodisponible est le résidu dont on peut démontrer, par une méthode appropriée, qu'il est absorbé après ingestion chez l'animal de laboratoire. Dans un sens plus large, les « résidus biodisponibles » sont aussi définis comme des composés (substance-mère et les métabolites) absorbés dans le tractus gastro-intestinal et qu'on peut trouver dans les

tissus et fluides biologiques des espèces animales qui l'ingèrent ainsi que dans le dioxyde de carbone expiré après métabolisation du composé **[37]**.

I.2.4.2. Notion de toxico-disponibilité

Les métabolites reconnus toxiques sont en général extractibles et donc relativement biodisponibles. Leur toxico-disponibilité est donc toujours à craindre **[39]**. Les résidus liés sont généralement peu biodisponibles. Leur toxico-disponibilité est donc faible. D'autre part, les résidus liés sont également peu accessibles à la réponse immune de l'organisme pouvant entraîner une réaction allergique **[40].**

I.2.5. Problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques

Les problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques sont de deux ordres: sanitaires et technologiques.

I.2.5.1. Problèmes sanitaires

I.2.5.1.1. Problèmes d'allergie

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques eten particuliers des bêta-lactames (car ces dernières sont à la fois très immunogènes et souvent utilisées.

Cependant, compte tenu de très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotiques administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu. D'autant plus, lorsque les antibiotiques sont administrés par voie orale, ils subissent des modifications qui tendent à diminuer leur pouvoir allergène. Les résidus de pénicilline en particulier forment des complexes avec certaines protéines (albumines) par liaisons covalentes, ils sont alors masqués par la structure tertiaire de l'albumine et deviennent inaccessibles aux anticorps. Il est donc peu probable que des dérivés significativement immunogènes puissent être formés.

Cependant des cas d'allergies aux résidus de pénicilline dans les aliments d'origine animale ont été scientifiquement prouvés, ceux-ci restent extrêmement rares (quelques cas seulement d'allergie à la pénicilline suite à la consommation des produits laitiers, ont été déclarés dans le monde en plusieurs décennies).

Les réactions allergiques ont été observées chez des personnes déjà sensibilisées avec la pénicilline par exemple, chez des sujets déjà sensibilisées des doses de 0.03 UI/ml dans le lait

peuvent être suffisantes pour entraîner des réactions allergiques : urticaires, dermatoses, prurit, choc, etc **[35].**

I.2.5.1.2. Risques toxiques

La toxicité directe des antibiotiques est dans l'ensemble extrêmement limitée, le cas de toxicité potentielle fréquemment cité est celui du chloramphénicol qui a été responsable d'anémies aplasiques chez l'homme (liées à son utilisation en médecine humaine), l'utilisation vétérinaire de cette molécule est désormais interdite un peu partout dans le monde **[35].**

I.2.5.1.3. Modification de la flore digestive du consommateur

Dans le tube digestif vivent en effet des milliards de bactéries saprophytes et commensales (surtout des bactéries anaérobies : bacteroïdes, fusobacterium).

La consommation de produits contenant des résidus d'antibiotiques (cycline, sulfamides) perturbe cette flore intestinale en modifiant sa composition par inhibition sélective (ils dévastent la flore normale et laissent place à d'autres espèces tel que E. coli, levures…,diminuent ainsi l'immunité naturelle préétablie, ce qui peut entraîner une atteinte du système nerveux, des os, des dents (coloration des dents en jaune), du foie, du sang ainsi que l'apparition de bactéries mutantes résistantes aux antibiotiques, engendrant des échecs thérapeutiques**[35].**

I.2.5.1.4. Risque d'antibio-resistances

Au cours des deux dernières décennies, les agents pathogènes résistants aux antibiotiques sont devenus un sérieux problème de santé publique. Une des raisons de l'augmentation de cette résistance pourrait résider dans l'utilisation préventive et thérapeutique d'antibiotiques en production animale car les médicaments vétérinaires contiennent en partie les mêmes matières actives qu'en médecine humaine. Les bactéries résistantes sont potentiellement transmissibles à l'homme via les denrées alimentaires.

L'apparition de cette résistance peut être liée à des mauvaises pratiques thérapeutiques (posologie inadaptée, fréquence d'administration, non-respect de la prescription…) ou à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance (sous forme d'additifs alimentaires), favorisant ainsi le développement rapide du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Il est important de préciser que la problématique de l'antibio-résistance doit être différenciée de celle des résidus d'antibiotiques. Ceux-ci peuvent avoir des répercussions sur la santé des consommateurs (allergies, etc.) mais ne sont pas en cause dans le développement de l'antibio-résistance. Par ailleurs, il faut souligner que ce ne sont pas les animaux où les humains qui deviennent résistants aux antibiotiques mais bien les bactéries qui les affectent **[35].**

I.2.5.2. Problèmes technologiques

Les résidus représentent un réel problème pour les transformateurs laitiers par leurs conséquences néfastes sur les fermentations lactiques et constituent le problème majeur des accidents de fabrication.

Les bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricusLactococcus lactis)* jouent un rôle essentiel comme ferment en acidifiant le lait (car ils transforment le lactose du lait en acide lactique et la présence de cet acide entraîne une baisse du pH ce qui permet la précipitation des protéines, le développement des arômes et l'inhibition de flores indésirables.

Les bactéries lactiques sont sensibles à de très faibles doses d'antibiotiques ainsi la présence de résidus d'antibiotiques inhibent de manière partielle ou totale la croissance de ces ferments et se traduit par de nombreux défauts notamment les accidents de fabrication du fromage, du yaourt et autres produits de fermentation du lait.

Les accidents les plus connus sont les défauts de coagulation du lait, l'insuffisance de l'égouttage et les risques de prolifération incontrôlée de germes gazogènes, insensibles aux antibiotiques telles que les Coliformes, Bacillus, Clostridium, Proteus, Aerobacter

De ce fait un lait contenant des antibiotiques ou des résidus d'antibiotiques n'est pas apte à la transformation **[35].**

I.2.6. Règlementation autour des résidus d'antibiotiques

Au début des années 1980, les progrès techniques ont permis un bon spectaculaire dans les méthodes de détection avec notamment le développement de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou en anglais HPLC). La politique du zéro résidu n'était alors plus tenable car des quantités infimes de résidus étaient presque systématiquement détectées. Ces quantités détectées étaient si faibles dans la grande majorité des cas qu'il devenait important d'évaluer le danger qu'elles représentaient vraiment pour la Santé Publique.

Deux notions très importantes sont alors apparues dans la réglementation, afin de compléter celle de résidus : la notion de Dose Sans Effet (DSE) et la notion de Limite Maximale de Résidus (LMR ou en anglais MRL) **[37].**

I.2.6.1. Définition de LMR

La LMR correspond à la concentration maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire, sans risque sanitaire pour le consommateur et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les denrées alimentaires **[37].**

I.2.6.2. Principes généraux des LMR

Les LMR sont établies au nom de chaque molécule pour chaque espèce de destination et non au nom de la spécialité pharmaceutique. Ainsi par exemple, deux médicaments vétérinaires composés du même principe actif antibiotique et destinés à la même espèce, se réfèreront à la même LMR pour ce principe actif antibiotique.

Les LMR appartiennent au domaine public et n'importe quel industriel peut les utiliser sans avoir à payer de « droits ». Cependant, les études réalisées par un industriel et ayant servies à l'établissement de la LMR pour une substance (principe actif ou ingrédient) dans une ou plusieurs espèces de destination, restent la propriété intellectuelle de l'industriel.

La Directive 90/676/CEE suivie du règlement 2377/90/CEE indique que tout médicament vétérinaire destiné aux animaux de production, c'est-à-dire les animaux destinés à la consommation humaine, doit avoir une LMR pour chacun de ses principes actifs et chacun de ses ingrédients pharmacologiquement actifs et dans chacune des espèces de destination de ce médicament, afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché **[37]**.

Dans le cas du lait, une substance doit obtenir une LMR lait pour chaque espèce de destination, pour que son utilisation soit autorisée chez les femelles en cours de production laitière dans ces espèces de destination. Si une substance n'a pas de LMR lait dans une espèce, le médicament vétérinaire la contenant ne peut pas être utilisé chez une femelle de cette espèce en lactation. La mise en évidence de ce résidu dans le lait de cette espèce correspond à un non respect de l'AMM et de la réglementation sur les résidus **[37]**.

I.2.6.3. Etablissement des LMR

L'établissement des LMR est basée sur 3 concepts principaux : pratiques de production selon les BPA, le régime alimentaire (niveau de consommation par le consommateur (exposition)) ; et toxicité des PPP (danger).

Les résultats des études pharmacologiques et de toxicité permettent de déterminer une Dose Sans Effet (DSE), c'est-à-dire une dose qui ne montre pas d'effets toxicologiques ou pharmacologiques dans les différentes études. Ensuite, cette DSE est divisée par un facteur de sécurité (100 à 1000) selon le profil toxicologique de la molécule pour aboutir à la Dose Journalière Admissible **[8].**

En tenant compte d'une répartition théorique des consommations quotidiennes des différentes denrées d'origine animale (foie, rein, graisse, muscle, peau, lait, œufs, miel) connue sous le nom de « panier de la ménagère » et sur la base des informations pharmacocinétiques disponibles sur le devenir de la substance dans les espèces animales de destination un industriel ou les experts du CVMP proposent les LMR à la Commission Européenne. Pour une substance donnée, sa DJA est ainsi répartie dans les différentes denrées du « panier de la ménagère » ce qui permet d'obtenir la LMR de cette substance dans chaque denrée.

Ainsi, les LMR sont établies dans la réglementation au niveau européen, pour chaque substance pharmacologiquement active selon une procédure bien établie afin de déterminer les quantités résiduelles ingérables lors de la consommation des différentes denrées d'origine animale **[37].**

Le tableau I.7 résume les LMR en Europe des principales molécules d'antibiotiques susceptibles d'être retrouvées dans le lait.

Tableau I.7. Limite Maximale des Résidus (LMR) des principaux antibiotiques (Exprimées en µg/kg ou ppm)**[41].**

Molécules	Familles d'antibiotique	LMR dans le lait
L'acide Oxolinique	Fluoroquinolones	**[0]**
Amoxicilline	Bétalactamines	**4**
Ampicilline	Bétalactamines	**4**
Bacitracine	Polypeptides	**100**
Cefacetrile	Bétalactamines	**125**
Cephalexine	Bétalactamines	**100**
Cefalonium	Bétalactamines	**20**
Cefapirine	Bétalactamines	**60**
Cefazoline	Bétalactamines	**50**
Cefopérazone	Bétalactamines	**50**
Cefquinome	Bétalactamines	**20**
Ceftiofur	Bétalactamines	**100**
Chloramphenicol	Phenicolés	**(0)**
Cloxacilline	Bétalactamines	**30**
Colistine	Polypeptides	**50**
Chlortétracycline	Tetracycline	**100**
Danofloxacine	Fluoroquinolones	**30**
Streptomycine	Aminoglycosides	**200**
Dicloxacilline	Bétalactamines	**30**

I.2.6.4. Législation algérienne

La législation algérienne dans sa définition du lait, dans l'article 6 de l'arrêté interministériel (le ministère de l'économie, le ministère de l'agriculture et le ministère de la santé et de la population) du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de

certains laits de consommation, mentionne le fait qu'un lait propre à la consommation humaine ne doit pas contenir des résidus d'antibiotiques mais ne précise pas explicitement des limites maximales de résidus **[42].**

I.2.6.5. Délai d'attente

I.2.6.5.1.Définition

Le temps d'attente est défini comme le délai entre la dernière administration à l'animale de l'antibiotique et le moment où celui-ci ne présente plus de résidus dans ses tissus ou dans ses productions (lait, œuf).

Le délai d'attente correspond donc à la durée minimale requise entre le dernier traitement de médicaments recommandé et l'abattage ou la collecte d'aliments (exemple : lait et œufs) , il est établi pour un schéma thérapeutique bien précis : espèces animales concernées, dose, rythme d'administration, voie d'administration, durée du traitement, etc.

Le respect de ce temps d'attente permet de commercialiser les denrées qui présentent des concentrations inférieures ou proches de la limite maximale des résidus garantissant la protection de la santé du consommateur **[35].**

I.2.6.5.2. Lien entre le temps d'attente et La limite maximale des résidus

La composition du médicament vétérinaire ainsi que ses conditions d'emploi (voie d'administration, posologie) influencent la pharmacocinétique des résidus, par conséquent, le moment où les concentrations dans les denrées alimentaires sont inférieures à la limite maximale des résidus doit être déterminé. Cet intervalle de temps entre l'administration du médicament et ce moment précis constitue le temps d'attente **[37].**

I.2.6.5.3. Méthode de calcul de temps d'attente dans le lait

Le calcul du temps d'attente est fondé sur le principe que dans 95 pour cent des groupes d'animaux traités, 95 pour cent des individus produisent un lait avec une concentration inférieure à la limite maximale des résidus (LMR), cependant le risque d'avoir une concentration dans le lait supérieure à la LMR n'est pas nulle mais reste sans danger pour le consommateur **[35].**

- **Expression de temps d'attente**

Initialement : le temps d'attente était exprimé sous forme d'un nombre de traite à éliminer avant de pouvoir commercialiser le lait.

Actuellement : compte tenu des différents types de traites rencontrées, le temps d'attente est exprimé en multiple de 12 heures, considérant que ce temps correspond à l'intervalle moyen entre deux traites. Par conséquent, il est exprimé en heures ou en jours éventuellement.

Le temps d'attente est noté « zéro » lorsqu'il n'est pas nécessaire d'éliminer le lait après un traitement **[35].**

I.2.7. Méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques

I.2.7.1. Historique et évolution des méthodes de détection dans le temps

L'utilisation des tests de détection des inhibiteurs est très ancienne, les premiers tests ont été utilisés quelques années après l'apparition des antibiotiques.

Dès 1952, le premier test de détection des inhibiteurs dans le lait était mis au point, il était fondé sur l'inhibition du développement de différentes souches de bactéries **[35]** selon ce dernier, deux voies de recherche ont été explorées :

- les recherches microbiologiques ont été améliorées en sélectionnant des souches et en modifiant les milieux de culture pour augmenter la sensibilité à certains antibiotiques et élargir le spectre,
- de nouvelles méthodes (immuno-enzymatique, …) ont été mises au point pour diminuer le temps d'analyse.

Le tableau I. 8 montre l'évolution des méthodes de détection dans le temps.

Tableau I.8. Evolution des méthodes de détection dans de temps **[35]**.

Année	Événements
1952	Développement d'un test de recherche des inhibiteurs dans le lait : *Bacillus subtilis*
1961	Développement du Br Test utilisant *Bacillus stearothermophilus*
1975	Développement du Delvotest SP utilisant *Bacillus stearothermophilus*
1978	Développement du Penzym - test enzymatique
1991	Proposition d'une méthode de détection utilisant *Bacillus stearothérmophilus* décision (91/180/CEE)
1994	Passage à la méthode de diffusion en tube
1997	Premier monitoring
2000	Texte relatif aux performances analytiques des méthodes mise en œuvres (Draft SANCO/1085/2000)
2000	Uniformisation : Delvotest MCS sur toutes les livraisons
2004	Abandon de la lecture visuelle au profit de la lecture réflectométrique
2005	Utilisation du Copan Milk Test
2007	Modification de la méthode de confirmation - introduction des tests rapides

I.2.7.2. Tests de dépistage des résidus d'antibiotiques

Le dépistage est effectué au moyen d'une méthode d'analyse qui donne une indication forte de la présence d'un résidu dans un échantillon, les tests de dépistage ont pour objectifs de détecter un maximum de substances différentes à un seuil proche ou inférieur à la limite maximale des résidus. Ils doivent aussi permettre de faire rapidement des analyses sur un grand nombre d'échantillons afin de retenir qu'un faible nombre suspects à soumettre à une méthode de confirmation.

Les méthodes de dépistage sont donc des méthodes qualitatives qui ont pour but de discerner les échantillons positifs des échantillons négatifs. Ces contrôles sont basés sur l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Les échantillons conformes sont acceptés tandis

que ceux suspectés d'être non-conformes doivent être confirmés à l'aide de méthodes de confirmation.

Pour le dépistage, les tests microbiologiques présentent l'intérêt d'avoir un spectre large, néanmoins ils présentent des inconvénients tels que le manque de sensibilité à certains antibiotiques et l'éventuelle sensibilité à des inhibiteurs naturels **[35]**.Les tests de dépistage doivent répondre aux critères suivants:

- sensibilité suffisante
- peu coûteux
- rapides
- préparation de l'échantillon réduite au minimum
- applicables à de nombreux échantillons en même temps
- détection de multi-résidus
- pas de faux négatifs
- peu de faux positifs

I.2.7.3. Méthode d'acidification

C'est une méthode d'acidification au *Streptococcus thermophilus,* suivie de la confirmation par la méthode de diffusion sur gélose au *Bacillus stearothermophilus*.

Le test officiel français d'acidification est un test de dépistage pour l'ensemble des résidus d'antibiotiques capables d'inhiber le développement de *Streptococcus thermophilus* dans le lait **[43].**

Principe

L'échantillon de lait est préalablement chauffé afin de réduire au maximum sa flore microbienne et de détruire les inhibiteurs naturels. Il est ensuite ensemencé avec une souche de *Streptococcus thermophilus* sensible aux antibiotiques et, en présence du triméthoprime, aux sulfamides ; l'addition d'extrait de levure permet d'accélérer la croissance de l'organisme-test. Après incubation de la culture, la production d'acide par les germes (qui transforment le lactose en acide lactique) révélée par un indicateur de pH et mise en évidence par changement de couleur d'un indicateur ajouté au milieu, est comparée à celle d'une culture témoin préparée à partir de lait exempt d'antibiotiques **[35].**

En présence d'antibiotiques ou de sulfamides, la production d'acide de l'organisme test est ralentie ou complètement inhibée donc il n'y a pas de production d'acide dans l'échantillon,

ce qui ne fera pas coaguler le lait et l'indicateur de pH ne changera pas de couleur de ce fait les résultats sont exprimés de la manière suivante :

→ résultat positif, lorsque l'échantillon de lait à examiner présente une coloration bleue

→ résultat négatif, lorsque l'échantillon de lait à examiner présente une coloration jaune

→ résultat douteux, lorsque le lait présente une coloration intermédiaire entre celle du témoin positif et celle du témoin négatif **[35].**

Seuls les résultats positifs ou douteux sont alors soumis à la confirmation par les tests de diffusion sur gélose (Anonyme. b, 2005) ; faisant intervenir trois germes différents : *Bacillus steatermophilus, Bacillus subtilus* et *Bacillus megaterium.*

Les trois tests reposent sur le même principe : un disque de papier filtre imprégné de lait à tester est déposé à la surface d'une gélose ensemencée. Les éventuels résidus diffusent concentriquement dans la gélose autour du disque, ce qui donne, après incubation, une zone dans laquelle le développement du germe a été inhibé, si le diamètre de cette zone d'inhibition est supérieur à 10 mm, le résultat est considéré comme positif **[35].**

I.2.7.4. Delvotest

C'est le test le plus utilisé, plusieurs versions sont proposées. C'est un test biologique simple, standardisé, fondé sur la multiplication d'un germe : *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis,* très utilisé par les laiteries, ce test n'est pas spécifique et offre un large spectre de détection et une bonne sensibilité vis-à-vis des pénicillines (qui représentent le plus grand risque technologique). Le principal inconvénient de ce test est sa durée d'incubation de 2 h30 à 3 h **[35].**

I.2.7.5. Premi® test

C'est un test de détection mis au point pour la détection des résidus d'antibiotiques, dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs.

L'échantillon est laissé à diffuser dans une ampoule contenant du milieu gélosé ensemencé par des spores de *Bacillus stearothermophilus* avec un indicateur de pH. Après incubation, la croissance normale des micro-organismes provoque l'acidification du milieu ce qui change la couleur de l'indicateur de pH du violet vers le jaune. En présence de substances inhibitrices (résidus d'antibiotiques), si la couleur du milieu reste violette après incubation, l'échantillon est rapporté comme échantillon positif, et si la couleur du milieu vire au jaune l'échantillon est considéré comme échantillon négatif **[44]**.

I.2.7.6.Méthode Star ou méthode des 5 boites

C'est une méthode de détection microbiologique des antibiotiques dans le lait, le muscle ainsi le foie gras, les crevettes, les poissons, etc.

Elle est basée sur le principe suivant : un micro-organisme est ensemencé dans un milieu gélosé, coulé en boîte de Pétri. Après diffusion, la présence des résidus d'antibiotiques produit une zone d'inhibition de l'échantillon en empêchant la croissance bactérienne du micro-organisme test. Un échantillon est considéré comme positif quand il donne une zone d'inhibition supérieure à 2 mm **[45]**.

I.2.7.7. Méthodes de confirmation

Les méthodes de dépistage doivent être complétées par des méthodes de confirmation qui sont appliquées sur les échantillons détectés positifs par les méthodes de dépistage. Les méthodes de confirmation doivent identifier sans ambiguïté la molécule de résidu et doivent pouvoir la quantifier à un niveau au moins deux fois inférieur à la LMR **[35].**

La procédure complète pour une analyse de confirmation est coûteuse en temps, en équipements et en produits réactifs. De plus, elle nécessite un personnel formé avec un bon degré d'expertise. Les méthodes de confirmation sont aujourd'hui des méthodes physico-chimiques, la confirmation des échantillons positifs se fait au moyen de méthodes analytiques comme **[35]** :

- La chromatographie liquide haute performance avec ionisation électro-spray à pression atmosphérique (HPLC-ESI) associée à la spectrométrie de masse (SM). C'est la technique de choix pour identifier et doser le chloramphénicol par exemple.
- L'HPLC-SM avec ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI en anglais).

La chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse en tandem est utilisée depuis le début de l'année 2002 par le laboratoire national de référence pour la confirmation des échantillons trouvés positifs par les méthodes microbiologiques dans le cadre du programme de contrôle des résidus d'antibiotiques mis en place par la DGAl. Cette technique est également utilisée pour la confirmation des échantillons détectés positifs dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle des substances interdites telles que le chloramphénicol et les nitroimidazoles **[35].**

A. Définition et généralités sur la chromatographie

La chromatographie est une méthode analytique, physicochimique qui a pour but la séparation des différents constituants d'un mélange même très complexe.

Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (un liquide ou un gaz) que l'on appelle la phase mobile ; elles interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec un support fixe (un solide ou un liquide fixé) que l'on appelle la phase stationnaire. Il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces deux types de phases, le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe qui va les séparer les unes des autres, la chromatographie permettra donc l'identification et la quantification de chacun des solutés initialement présents dans la solution analysé **[35].**

A.1. Chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Une analyse HPLC permet la séparation de composés en solution élués à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile liquide, elle-même percolée grâce à une pression élevée. Il existe une réelle interaction triple entre l'analyte, la phase stationnaire et la phase mobile basée sur l'affinité physicochimique entre les trois.

Dans tous les appareils de chromatographie liquide haute performance, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre **[35]** :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile
- une ou plusieurs pompes
- un système d'injecteur
- des colonnes
- un ou plusieurs détecteurs
- et un ordinateur (enregistreur)

Ces modules sont illustrés sur la figure I.1.

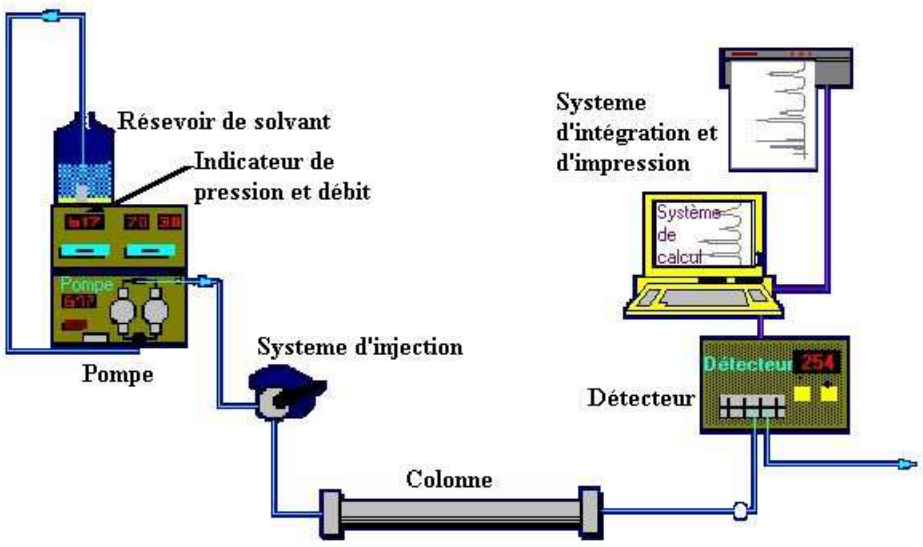


Figure I.1. Instrumentation de l'HPLC **[35]**

A.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM, en anglais TLC pour *Thin layer chromatography*) est une technique de chromatographie planaire dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative) **[46].**

Elle comprend :

- une phase stationnaire : une couche mince de matériel absorbant (usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose) ;
- une phase liquide, dite phase mobile ou éluant : un solvant ou un mélange de solvants qui va entraîner les composés à se séparer le long de la phase stationnaire.

Le phénomène d'adsorption est prépondérant (mais il y a également partage si le solvant est un mélange) pour les phases stationnaires polaires. Dans le cas des *phases inverses*, c'est-à-dire hydrophobes, c'est le phénomène de chromatographie de partage qui prédomine **[46].**

La figure I.2. Résume les différentes étapes de la chromatographie sur couche mince.

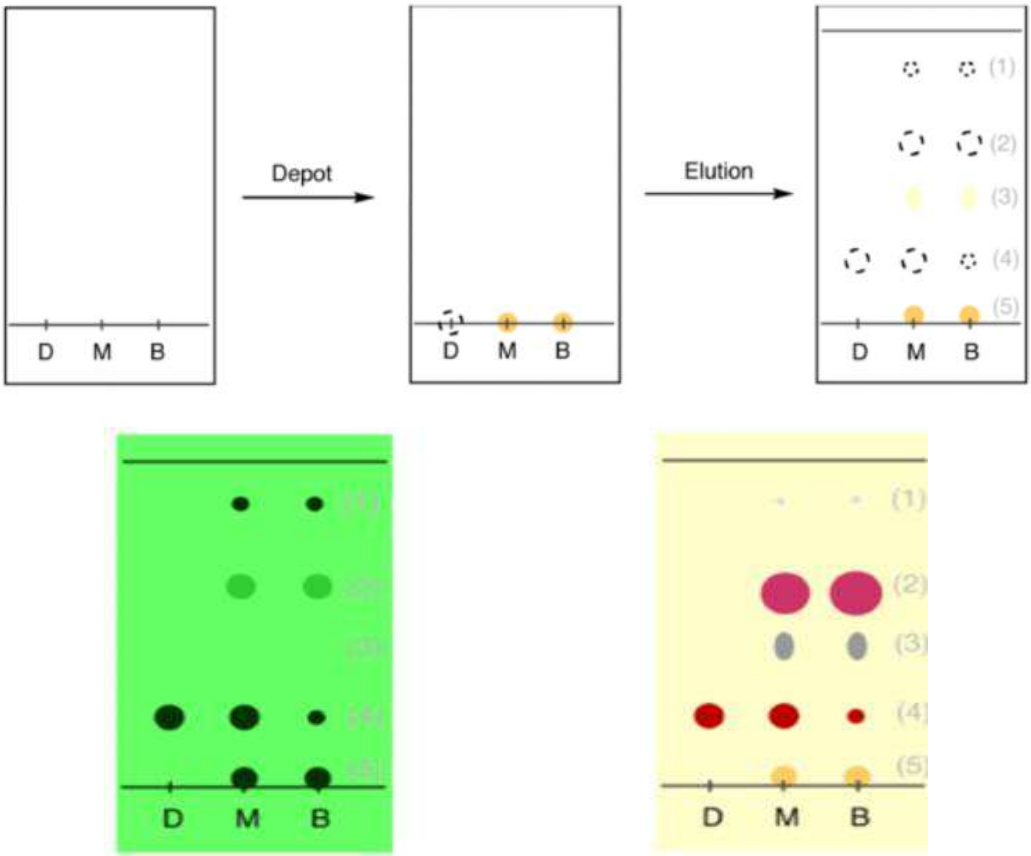


Figure I.2. Etapes du Chromatographie sur couche mince.

II.1. Introduction

L'étude expérimentale qui a été réalisé au niveau des laboratoires de trois sites de la wilaya de Médéa, à savoir les laboratoires du hall technologique de l'université de Médéa, les laboratoires (physicochimie et microbiologie) du complexe Antibiotical (SAIDAL) et enfin le laboratoire de microbiologie de la direction de la santé publique (DSP), porte principalement sur la recherche des résidus d'antibiotiques sur quelques échantillons du laits crus et quelques produits laitiers vendus sur le marché de la wilaya de Médéa.

A cet égard, nous avons suit les points suivants :

- Caractérisation physicochimique des échantillons du lait.
- Caractérisation microbiologique du lait crus et des produits laitiers.
- Recherche des résidus d'antibiotiques dans les échantillons collectés par deux méthodes : une méthode microbiologique et une méthode analytique (HPLC).

II.2. Matériel et produits

L'ensemble du matériel et des produits utilisés au cours de cette étude est regroupé dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Matériel et produits utilisés

Matériel	Réactif
- pH-mètre - Spectrophotomètre - Centrifugeuse - Balance sensible à 0.1 mg - étuve - Thermomètre - Bain marie - Dessiccateur - Etuve - Compteur des colonies - Disques vierges - Boites de Pétri - Anses de platine - Bec bensen	- permanganate de potassium $KMnO_4$ - Solution Fehling A - Solution Fehling B - Solution de sulfate de cuivre - Solution de sulfate de Zinc - Sulfate ferrique - Eau distillé - solution de sulfate - cuivre et zinc - Solution phénophtaléine à 1 % - Hydroxyde de sodium 0.1N - Acide chlorhydrique

Dans la partie microbiologie, les différentes souches bactériennes utilisées sont:

- **Souches de *Bacillus subtilis*** (Réf : ATCC6631) : est une bactérie résistante qui est présente dans les sols. On retrouve le *Bacillus subtilis* sur des aliments qu'il contamine. Une fois ingéré, le *Bacillus subtilis* peut être à l'origine d'une intoxication alimentaire. Dans l'industrie agroalimentaire, on utilise le *Bacillus subtilis* pour produire des enzymes du type amylase qui servent à fabriquer du pain. La bactérie entre également dans la composition de produits détergents. En pharmacie, le *Bacillus subtilis* est utile dans les traitements antibiotiques **[47]**.

- **Souches de *Bacillus stéarothermophilus*** (Réf : ATCC7953) : est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet. Elle est mobile, produit des spores et est thermophile. Elle est responsable de quelques cas de toxi-infections alimentaires où il a pu être isolé en grand nombre (plus de un million par gramme) à partir des aliments suspects (viandes froides, pâtés, farces, pizza, pains complets...). Ce germe a été impliqué dans des avortements chez les ovins et, chez les bovins, il est l'agent de mammites aiguës, récidivantes malgré un traitement antibiotique (pénicilline par exemple) qui, au vu des résultats obtenus *in vitro*, aurait dû être efficace.
  Elle est utilisée pour la recherche de résidus d'antibiotiques et de sulfamides dans le lait cru **[48].**

- **Souches de *Escherichia coli*** (Réf : ATCC10536) : également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale (Gram négatif) des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou sepsis **[49]**.

- **Souches de *Staphylococcus aureus*** (Réf :ATCC6538) : le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et

catalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom **[50]**.

II.3. Localisation et conditions de prélèvement du lait et des produits laitiers

Cette étude a porté sur un total de 40 prélèvements de lait cru collectés par vache au niveau de 4 régions (Béni Atli, Ouled Brahim, Kwala et Ben-chikaou) de la wilaya de Médéa, 10 échantillons du beurre de vache et 10 échantillons de yaourt achetés au niveau du marché de la wilaya de Médéa.

La distribution des échantillons selon les régions de prélèvement ainsi que leur notation sont représentées sur le tableau II.2.

Tableau II.2. Distribution des échantillons selon les régions de prélèvement

Région	Nombre d'échantillons et leur notation
Lait	
Beni Ateli	12(CH)
OuledBrahim	16(T)
Kouala	9(F)
Ben chikaou	3(R)
Beurre	
Médéa centre	10 (B)
Yaourt	
Médéa centre	10 (Y)

Des prélèvements de lait de 100 ml ont été réalisés par vache dans des flacons en plastiques stériles et étanches, clairement étiquetés et identifiés (Figure II.1). Les échantillons ont été transportés dans une glacière avant d'être congelés dans les 40 minutes suivant leur prélèvement jusqu'au moment de leur analyse.

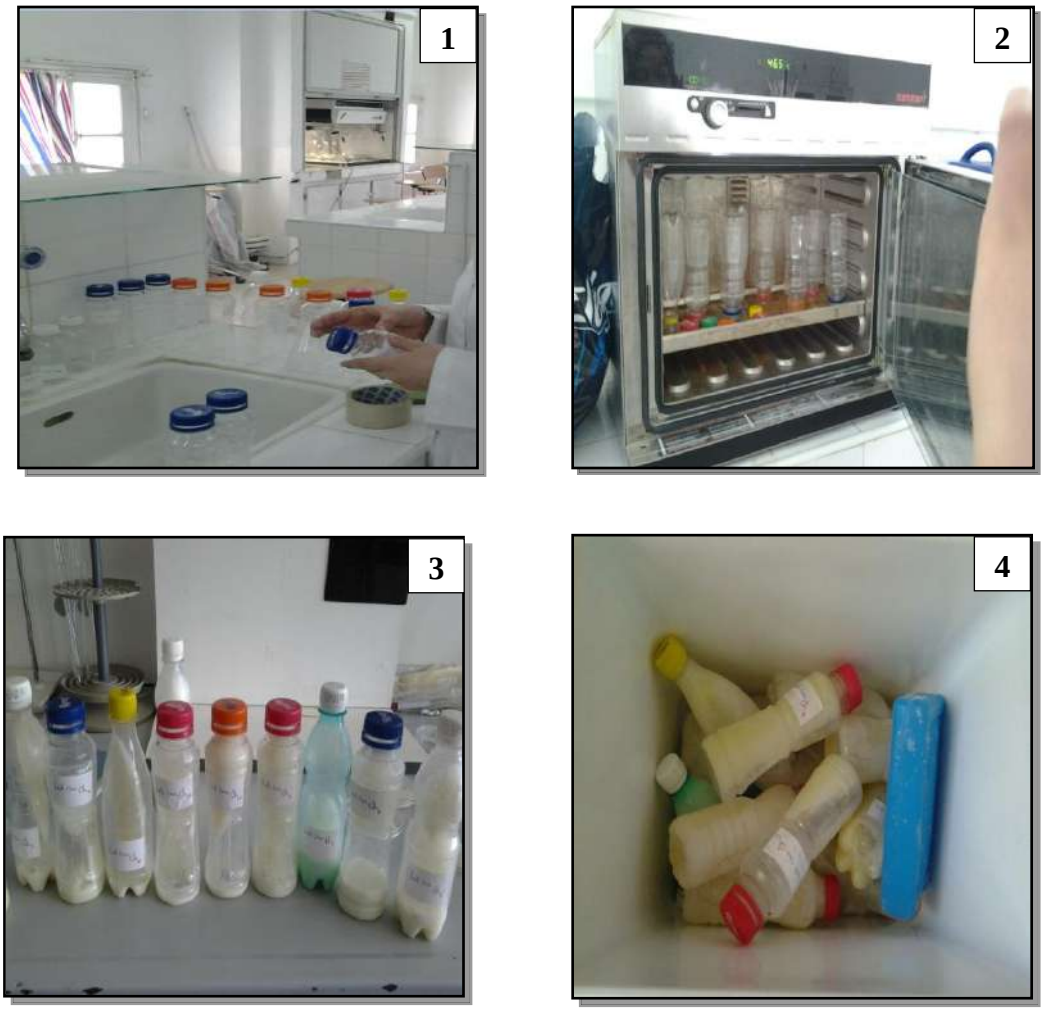


Figure. II.1 : Différentes étapes de prélèvement du lait cru

1- Identifications des flacons *3- Echantillons du lait;*

2- Stérilisation des flacons; *4- Lait congelé.*

II.4. Analyses physicochimiques du lait cru

Tous les échantillons du lait cru ainsi que des produits laitiers ont été soumis à des analyses physicochimiques appropriés. Avant d'être testés, tous les échantillons du lait ont été chauffés afin d'amener le lait à son état liquide.

II.4.1. Mesure de pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre type HANNA instrument par trempage dans un petit volume de lait prélevé dans un bécher comme le montre la figure II.2. Le pH-mètre

est préalablement étalonné aux pH 7,02 et 4,00. L'électrode est rincée abondamment à l'eau distillée après chaque utilisation.



Figure II.2. Mesure du pH du lait

II.4.2. Détermination de la densité

La densité d'une substance est égale à la masse volumique de la substance divisée par la masse volumique du corps de référence à la même température. Pour les liquides et les solides, l'eau est utilisée comme référence, pour les gaz, la mesure s'effectue par rapport à l'air. Elle est notée d et n'a pas d'unité (grandeur physique sans dimension) **[51]**.

$$d = \frac{\rho(substance\ )}{\rho(eau\ )} \qquad \textbf{(II.1)}$$

avec :

ρ : Masse volumique (kg/l).

La masse volumique de l'eau est mesurée à la température de 4°C, qui correspond à une température où sa masse volumique passe par un maximum. On indique cette température de référence en mettant 4 en indice. La notation devient alors d_4. Pour des raisons pratiques, la mesure de la masse volumique de la substance s'effectue à la température ambiante et généralement à 20°C. Il est donc usuel de noter la densité d'un solide ou d'un liquide en indiquant les 2 températures : d^{20}_4 qui signifie donc « densité de la substance à 20°C par rapport à de l'eau à 4°C ».

Pour une mesure plus précise, on utilise un pycnomètre. Ce petit récipient dont la forme rappelle celle de la fiole, est caractérisé par un volume très précis. La détermination de la densité s'effectue par pesée (Figure II.3). Il est impératif de conserver le même instrument pour mesurer la masse d'eau et la masse d'échantillon étudié **[51]**.

- Il faut signaler que dans notre cas, on a utilisé une fiole jaugée à la place du pycnomètre.



Figure II.3. Détermination de la densité par pesée

II.4.3. Détermination de la teneur en lactose

La teneur en lactose du lait de vache est généralement déterminée par la méthode de Bertrand. Cette méthode permet de doser, en milieu basique, l'ensemble des glucides dits réducteurs comme le glucose, le fructose et aussi le lactose **[52]**.

II.4.3.1. Principe

Après défécation au ferrocyanure de Zinc, le lactose est dosé dans le filtrat, grâce à son pouvoir réducteur, par la méthode de Bertrand. On exprime généralement le résultat en lactose hydraté. Celui-ci sera valable que si le lactose n'a subi aucun début d'hydrolyse **[52]**.

II.4.3.2. Mode opératoire

La détermination du taux en lactose se déroule en trois étapes :

A. Dilution du lait

5 ml de lait cru est dilué à 100 ml dans une fiole jaugée en utilisant l'eau déminéralisée.

B. Défécation

1- Introduire dans un tube d'une centrifugeuse :
   - ✓ 5 ml de lait dilué (préalablement stérilisé pour éliminer les micro-organismes),
   - ✓ 5 ml de solution défécante (solution de sulfate de cuivre et de zinc).

2- Laisser agir au moins 5 minutes pour précipiter les protéines et les matières grasses, puis centrifuger à 4500 rpm pendant 5 min.

3- Récupérer le filtrat (figure II.4.a).

C. Dosage du lactose

1- Formation du précipité d'oxyde de cuivre (I)

Dans un erlenmeyer on introduit :

- ✓ 20 ml de réactif de Fehling A.
- ✓ 20 ml de réactif de Fehling B.
- ✓ 20 ml de filtrat.

L'ensemble est porté à ébullition modérée pendant trois minutes. Il se forme un précipité rouge d'oxyde du cuivre (I) comme le montre la figure II.4.b.

2- Dosage des ions fer (II)

Après dissolution du précipité d'oxyde du cuivre par la liqueur ferrique qui conduit à la formation d'ions fer (II), ces derniers sont dosés par une solution de permanganate de potassium (0.02 M) (figure II.4.c).

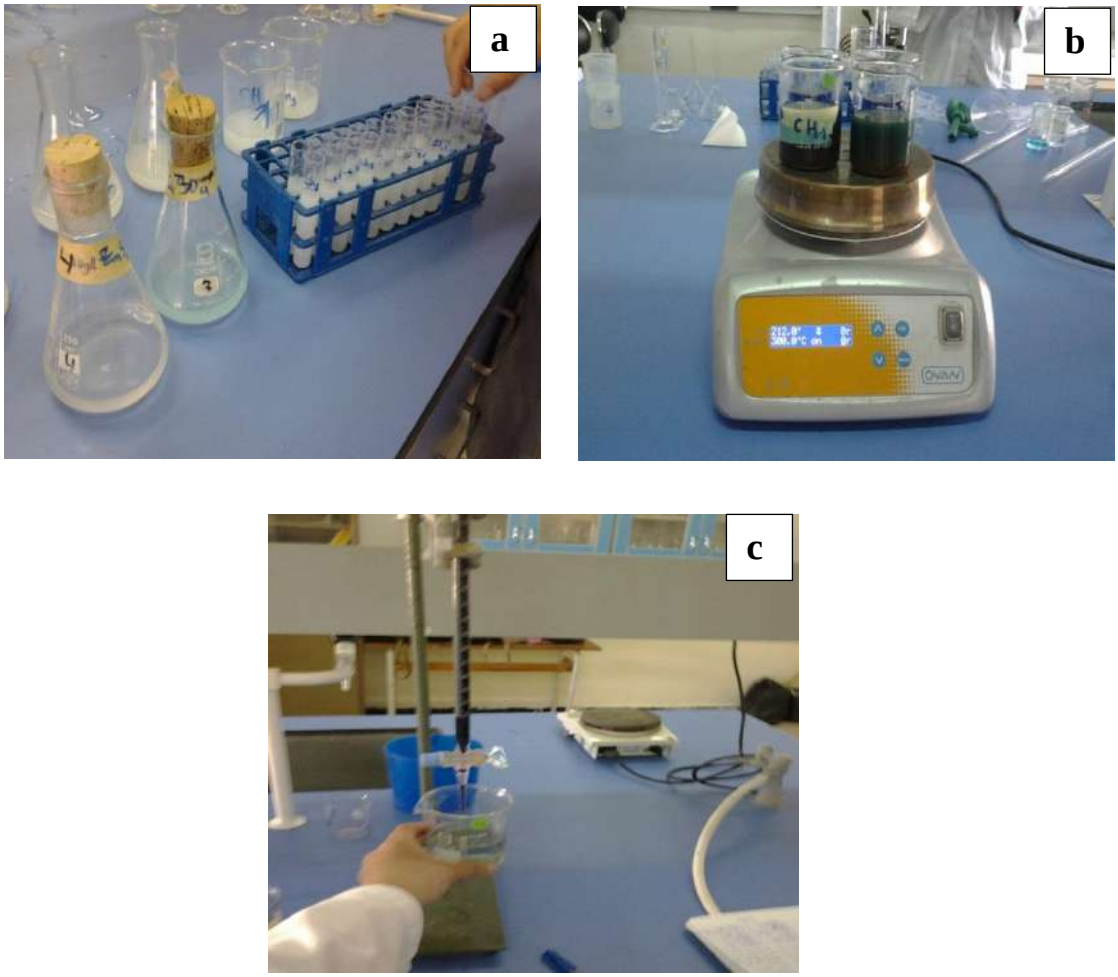


Figure II.4 : Différentes étapes pour détermination de la teneur en lactose par la méthode de Bertrand, **(a)** : Défécation du lait,

(b) : Formation du précipité d'oxyde de cuivre(I),

(c) : Dosage des ions de fer II

II.4.4.Détermination de la matière sèche

On désigne sous le nom de matières sèches, le produit qui résulte de la dessiccation du lait dans les conditions définies par le mode opératoire, avec pesée du résidu.

II.4.4.1. Mode opératoire

10 ml de lait contenu dans une capsule de silice est chauffé au bain-marie bouillant, pendant 1 heure. Ensuite, la capsule est mise dans une étuve chauffée à une température de 103°C pendant 3 heures. A la sortie de l'étuve, la capsule est introduite directement dans un dessiccateur **[53]**. La matière sèche, exprimée en pourcentage en masse est calculée par la formule suivante **[53]:**

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \qquad \textbf{(II.2)}$$

Avec :

m_0 : la masse de la capsule (g),

m_1 : la masse de la capsule et de la prise d'essai liquide (g),

m_2 : la masse de la capsule et de la prise d'essai sèche (g).

II.4.5. Détermination de l'acidité titrable en Dornic

L'acidité du lait peut être titrée de façon précise à l'aide de la soude Dornic (N/9). Un échantillon précis de 10 ml de lait est placé dans un bécher de 100 ml en présence de 0,1 ml de phénolphtaléine à 1% dans l'alcool à 95%. La soude Dornic (N/9) est rajoutée (à l'aide d'une burette) jusqu'au virage au rose. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes **[54]**.L'acidité A exprimée en degré Dornic (°D) est donnée par la formule suivante :

$$A\ (°\ D) = (10 \times V) \qquad \textbf{(II.3)}$$

Avec :

V : Volume du la soude versée en ml.

On note ici que : 1 °D représente 0,1 g d'acide lactique dans un litre de lait.

II.4.6. Test de formol

Ce test permet de déceler la présence de formol dans le lait **[55]**. Pour ce faire, le mode opératoire suivant a été réalisé comme le montre la figure II.5 :

- Dans un tube à essai, verser 10 ml d'acide chlorhydrique concentré,
- Puis ajouter 2 ml de lait, le mélange obtenu est couleur jaune,
- Placer le tube dans un bain marie à 37°C pendant 10 min.
- Observer le résultat (changement de couleur).
- Couleur jaune (négative),couleur bleu (positive).



Figure II.5 : Réalisation du test de formol

II.5. Analyses microbiologiques

L'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru consiste à la recherche des germes pathogènes, des germes utiles et des germes nuisibles à la conservation. Généralement, les principaux tests réalisés dans les analyses microbiologiques sont :

- ✓ Flore mésophile aérobie totale (FAMT) ;
- ✓ Bactéries témoins de contamination fécale : Coliformes, Streptocoques fécaux ;
- ✓ Flore pathogène : Salmonelles, Staphylocoques.

Dans notre étude et pour des raisons d'un manque affreux des moyens, nous avons réalisé que le test de FAMT. Ce test est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un produit ou sur une surface .Ce dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du produit.

II.5.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile total (FAMT) dans le lait et les produits laitiers

Pour chaque prélèvement, 10 ml d'échantillon à analyser ont été ajoutés dans un erlenmeyer à 90 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi une dilution mère de 10^{-1} à partir de laquelle on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} (voir figure II.6.a).

A partir des dilutions réalisées (10^{-1} jusqu'à 10^{-6}), on prélève aseptiquement 1 ml de chaque dilution et on le met dans une boîte de Pétri vide, puis on coule environ 15 ml du milieu gélosé PCA (Plate Count Agar) fondu au préalable au bain marie et maintenu à 45°C (figure II.6.b). Pour homogénéiser l'inoculum à la gélose, des mouvements circulaires et des va-et-vient ont été effectués.

On laisse solidifier, puis les boites sont incubées à 37°C pendant 72 heures **[56-58]**.

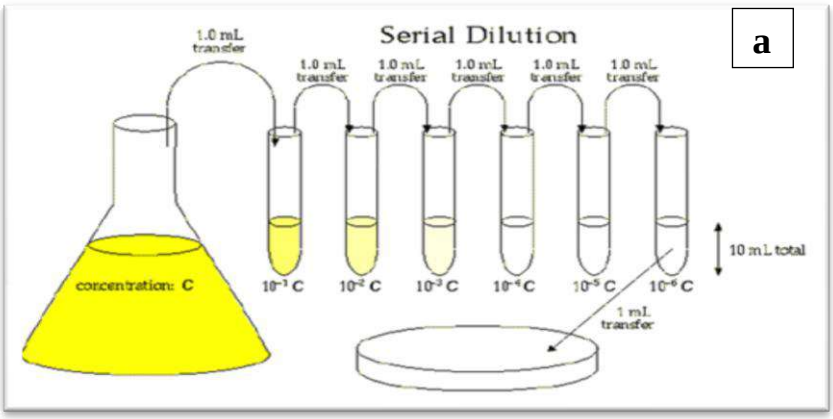






Figure II.6 : Différentes étapes du test FAMT, **a)**Technique de dilution en cascade, **b)** dépôt des échantillons dans les boites Pétri ; **c)**Ajout du milieu gélosé PCA

Il faut signaler ici que les échantillons du beurre (figure II.7) avant d'être analysés ont été fondus dans un bain marie à 50°C. Quant aux échantillons du yaourt (figure II.7), ces derniers ont été bien homogénéisés manuellement pour faciliter les prélèvements.





Figure II.7 : Différents échantillons des produits laitiers analysés

Selon la littérature les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300. Au-dessus 300, elles sont indénombrables, en dessous 30 on considère qu'elles sont trop rares pour être dénombrées. L'appareil utilisé pour le comptage des colonies après incubation est représenté sur la figure II.8.



Figure II.8: Appareil du comptage des colonies après incubation.

II.6. Recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru et les produits laitiers

La recherche de résidus d'antibiotiques dans les échantillons étudiés a été effectuée par deux méthodes :

- ❖ Une méthode microbiologique : méthode de diffusion sur gélose.
- ❖ Une méthode analytique : chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Avant de passer aux analyses proprement dites, nous avons commencé par un sondage sur terrain. Il s'agit d'un questionnaire réalisé auprès d'un vétérinaire dont l'objectif est de :

- connaître les différents antibiotiques utilisés dans le terrain algérien pour l'élevage des bovins afin de cibler les familles d'antibiotiques à rechercher au niveau du laboratoire.
- connaître la nécessité d'utilisation de ces antibiotiques, leur période d'utilisation et bien évidemment le respect du délai d'attente.

Plusieurs questionnaire ont été faite par de nombreux chercheurs et qui ont constaté que les antibiotiques les plus utilisés en élevages bovins laitiers sont les oxytétracyclines et les pénicillines. Cette domination peut s'expliquer par plusieurs raisons : l'efficacité du produit

reste un critère très important pour le choix des antibiotiques, associé au délai d'attente plus court, le large spectre de ses molécules, la disponibilité ainsi quelle cout moins chère.

II.6.1. Méthode de diffusion sur gélose

Selon la méthode officielle européenne de détection des résidus d'antibiotiques dans le lait (Décision de la commission 91/180/CEE du 14 février 1991) et, qui est appliquée dans la communauté européenne depuis le 1er janvier 2002 (Décision européenne 91/180.CEE ; Règlement CE N°1664/2006), la recherche de résidus d'antibiotiques dans le lait s'effectue en deux techniques réalisées successivement :

- → Un test d'acidification qui repose sur la mise en évidence d'une éventuelle inhibition de *Bacillus stearothermophilus* indiquée par le virage d'un indicateur coloré par les résidus d'antibiotiques qui seraient présents dans l'échantillon.
- → Suivi par une épreuve de confirmation, correspondant à la réalisation de deux tests de diffusion en gélose l'un avec *Bacillus subtilis* à 30°C et l'autre avec *Bacillus stearothermophilus* à 55°C.

Dans notre cas, le manque des moyens nous a obligés de passer directement à la deuxième technique de diffusion sur gélose.

Il faut signaler ici que, plus les deux souches indiquées auparavant (*Bacillus subtilis* et *Bacillus stearothermophilus*) nous avons testé également deux autres souches qui sont *E. coli* et *Staphylococcus aureus*.

II.6.1.1. Principe de la diffusion sur gélose

Une souche sensible aux antibiotiques est ensemencée dans le milieu Mueller-Hinton coulé en boite de pétri. Sur cette gélose, des disques imprégnés d'antibiotique ou de l'échantillon à examiner sont déposés. Après incubation, une zone d'inhibition apparaît autour du disque contenant un antibiotique en quantité suffisante pour être actif sur la souche.

La méthode est basée sur la diffusion de substances antibiotiques imprégnées sur des disques en papier préalablement séchés qui doivent être déposés à la surface de la gélose. Les disques appliqués sur la gélose absorbent une quantité d'eau suffisante pour dissoudre l'antibiotique qui diffuse ainsi progressivement dans le milieu **[59]**.

Remarque importante

Avant d'entamer la technique proprement dite, nous avons procédé au premier lieu au contrôle de la sensibilité des souches choisies envers quelques antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des bovins laitiers : Spiramycine, Streptomycine, Chlorotétracycline, pénicilline G, Amoxicilline.

II.6.1.2. Mode opératoire

A) Préparation du milieu de culture : Mueller-Hinton

Ce milieu est reconnu comme étant le milieu de référence le plus satisfaisant grâce à :

- Sa faible teneur en thymine-thymidine (éléments inhibiteurs de l'activité antibiotique du triméthoprime) diminue les phénomènes de repousse autour de ces disques et permet une détermination précise des diamètres d'inhibition.
- Sa concentration en Ca^{2+} et Mg^{2+}, qui assure une meilleure précision pour la détermination de la sensibilité des *Pseudomonas* aux aminosides, colistine et tétracyclines.

Le milieu gélose Muller Hinton est fondu à 100°C, puis refroidi à 55°C est coulé dans des boites Pétri.

B) Préparation de l'inoculum et ensemencement des boites de Pétri

A partir d'une culture jeune de 18h à 24 h, une suspension bactérienne est réalisée directement à partir des colonies en solution salée pour atteindre une turbidité, son opacité doit être équivalente à 0,5 Macro- Farland ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 lu à 625 nm **[59]**.

Pour l'ensemencement des boites de Pétri, les étapes suivantes ont été soigneusement réalisées :

1. Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
2. L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
3. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
4. Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
5. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
6. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boites de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

C) Application des disques dans les boites de Pétri

1. Mettre 2 ml de chaque échantillon à analyser dans des tubes stériles, puis les placer dans un bain marie à 80°C pendant 10 min pour éliminer les inhibiteurs naturels.
2. Emerger les disques vierges dans chaque échantillon et laisser 2 à 3 min pour assurer une bonne imprégnation.
3. A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de chaque échantillon et le déposer dans une boite de pétri, puis l'appuyer légèrement pour l'enfoncer dans la gélose contenant la souche appropriée.

D) Incubation et lecture des résultats

L'incubation est réalisée comme suit :

1- *E-Coli* : à 37°C pendant 24 heures ;
2- *Staphylococcus aureus* : à 37°C pendant 24 heures ;
3- *Bacillus subtilis* : à 37°C pendant 24 heures ;
4- *Bacillus stéarothermophilus :* à 55°C pendant 24heures ;

Après les durées d'incubation nécessaires pour chaque souche, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle.

La figure II.9 regroupe les différentes étapes réalisées pour la méthode de diffusion sur gélose.

Remarque :

- Il faut noter ici que le beurre a été fondu avant d'être utilisé et le yaourt a été bien homogénéisé sans être chauffés à 80°C.

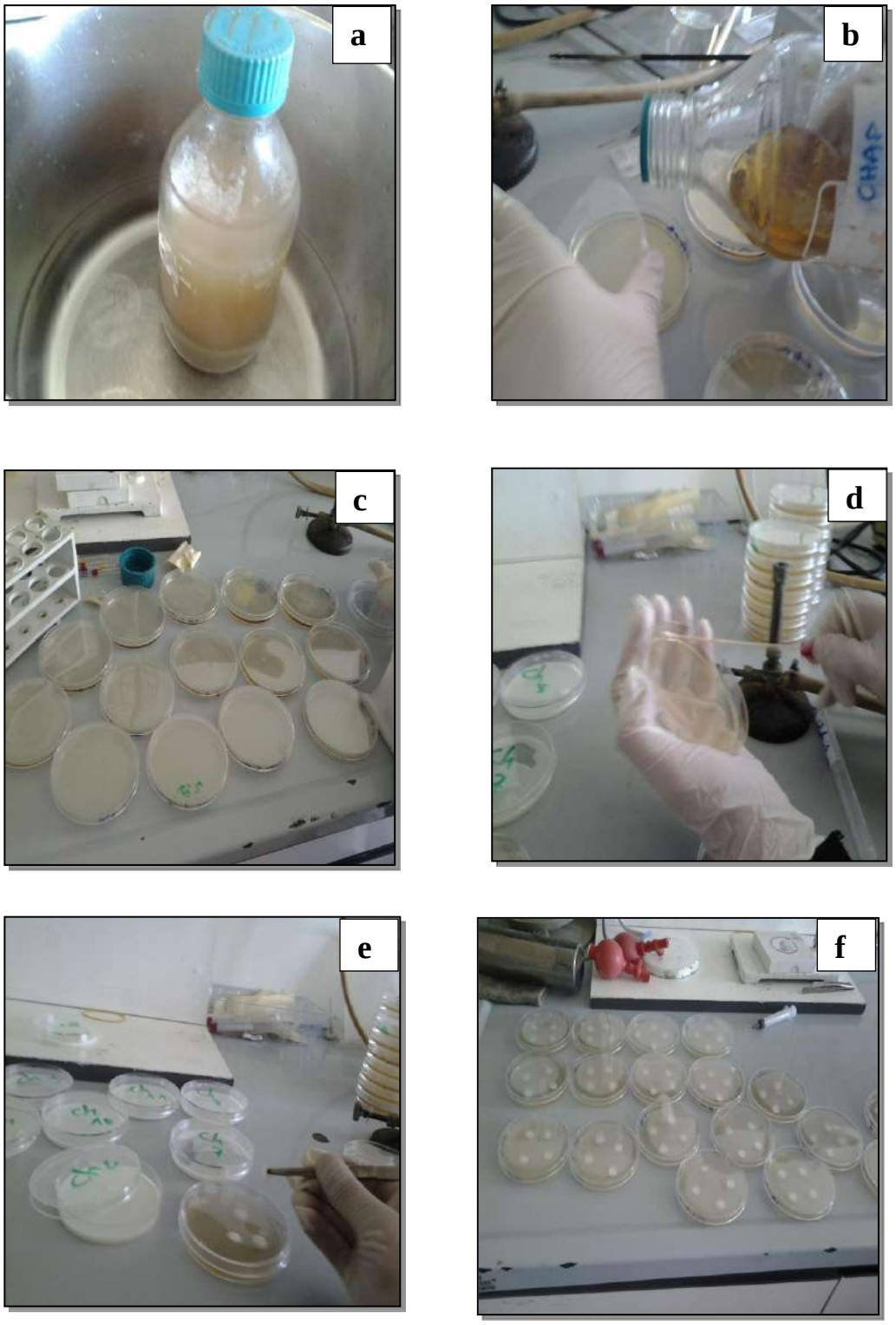


Figure II.9. Différentes étapes de la diffusion sur gélose
(a) Fondation du milieu utilisé, **(b)** coulage des boites Pétri,
(c)solidification du milieu sur les boites Pétri, **(d)** Encemencement du milieu par les souches,
(e) dépôt des disques d'échantillons, **(f)** boites de Pétri prètes à l'incubation

II.6.2. Méthode analytique : HPLC

II.6.2.1. Principe

La phase mobile parcourt un tube appelé colonne, cette colonne peut contenir des granulés poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire.

Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne ce mélange doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne.

De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injectés se déplacent tous moins vîtes que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparé. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme, en effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé, il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic. Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

Le principe est donc d'exploiter les interactions entre les solutés et les deux phases (mobile et stationnaire) pour séparer ces solutés en fonction de leurs affinités et ainsi de les identifier et ou de les doser. La chromatographie liquide haute performance classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté, phase mobile et phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases en présence **[35].**

II.6.2.2. Mode opératoire

Afin de pouvoir détecter les résidus d'antibiotiques dans le lait par chromatographie haute performance liquide, nous avons essayé d'adopter une méthode d'extraction des antibiotiques dont le protocole est le suivant:

On prépare un mélange de : 10 ml de lait + 20 ml d'acétonitrile + 6 ml d'eau pour HPLC. Le mélange est répartis en quatre tubes, ces derniers sont mélangés au vortex pendant 1

minute puis centrifugés pendant 10 min à 6000 tours/min. Après la première centrifugation, les surnageants (portions aqueuses) des 4 tubes sont recueillis puis filtrés avec les filtres de Whatman.

Les surnageants ainsi filtrés sont ajoutés et mélangés avec 20 ml d'acétonitrile puis repartis en 4 tubes, mélangés au vortex pendant 1min et centrifugés pendant 5 min à3000 tours/min. Après cette deuxième centrifugation les portions aqueuses sont récoltées à nouveau puis filtrées deux fois ; la première avec un filtre de Whatman et la deuxième avec un filtre 0.45 µm/ 47 mm membrane nylon **[35].**

Avant de détecter et de quantifier les résidus d'antibiotiques dans le lait, il a fallu procéder à l'étalonnage de l'appareil HPLC à l'aide du 4 standard de (chlorotétracycline, Pénicilline, Oxacilline, gentamycine) ces derniers sont accompagné de prospectus dans lesquels sont mentionnées les conditions d'analyse suivantes :

- colonne : L = 250 mm, D = 4.6 mm.
- phase mobile : mélange 25% acétonitrile et 75% (eau pour HPLC+ 0.07% Na_2HPO_4).
- concentration : 0.15 mg/ml.
- débit : 1ml/min
- détecteur : UV-220 nm
- volume d'injection : 20 µl
- linéarité : vérifiée

La figure II.10.regroupe les différentes étapes réalisées pour l'analyse par HPLC.

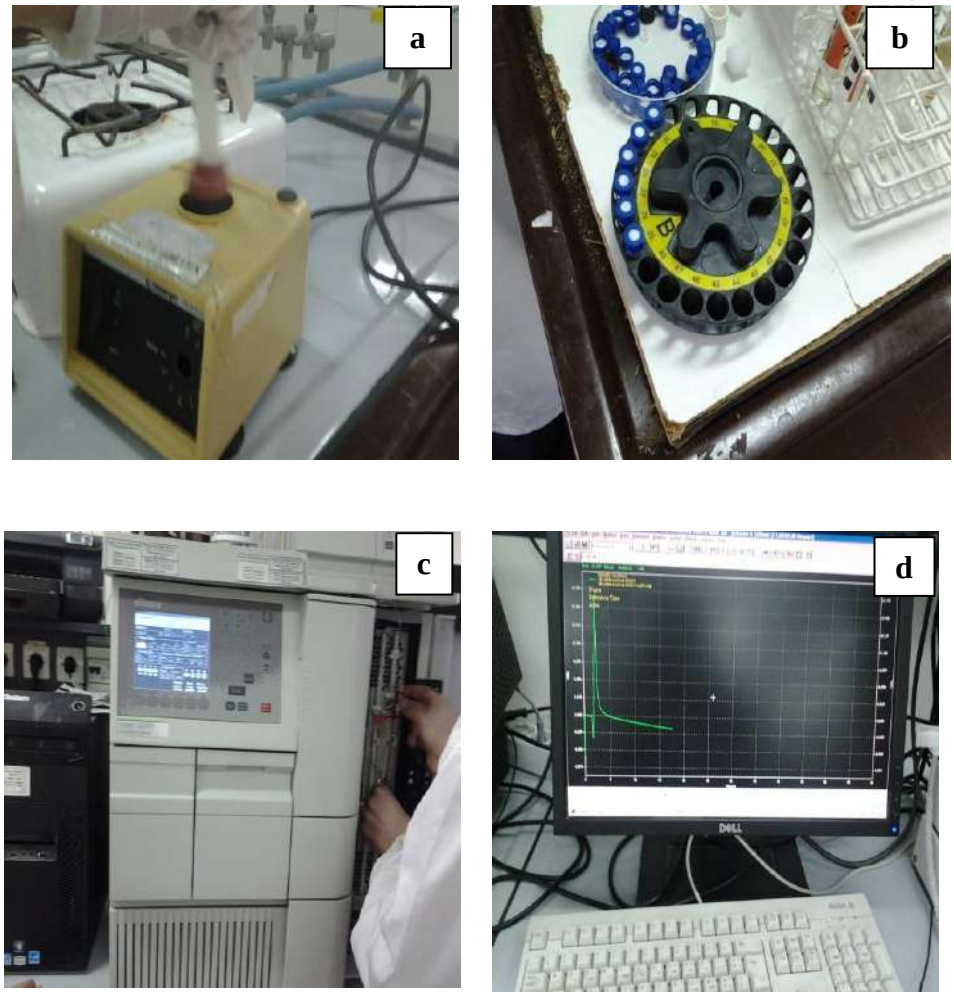


Figure II.10. Déférentes étapes réalisées pour HPLC

(a) Homogénéisation par vortex, **(b)** Centrifugation,

(c) Injection de la colonne **(d)** obtention du chromatogramme

III.1.Analyses physicochimiques du lait cru

III.1.1. Mesure du pH

Le pH a une importance exceptionnelle par l'abondance des indications quelle donne sur la richesse du lait en certains de ces constituants, sur son état de fraicheur ou sur sa stabilité. Les résultats des mesures du pH réalisées pour les 40 échantillons du lait sont regroupés dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Valeurs du pH des échantillons du lait cru

Echantillons	CH1	CH2	CH 3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10
Ph	**6.56**	**6.70**	**6.78**	**6.85**	**6.88**	**6.89**	**6.87**	**6.67**	**6.90**	**6.89**
Echantillons	CH11	CH12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
pH	**6.83**	**6.94**	**6.33**	**6.27**	**6.80**	**6.72**	**6.19**	**6 .53**	**6.62**	**6.50**
Echantillons	F9	R1	R2	R3	T1	T2	T3	T4	T5	T6
pH	**6 .41**	**6.42**	**6.32**	**6.23**	**6.40**	**6.52**	**6.66**	**6.59**	**6.62**	**6.50**
Echantillons	T7	T9	T10	T11	T12	T14	T15	T16	T18	T19
pH	**6.61**	**6.87**	**6.94**	**6.67**	**6.69**	**6.68**	**6.83**	**6.72**	**6.50**	**6.86**
Moyenne	**6.81**									

Les résultats obtenus montrent que les valeurs du pH varient de 6 ,19 à 6,94 avec une valeur moyenne de l'ordre de 6,81. Les valeurs de pH relevées dans la présente étude se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs tel que LABIOUI, 2009 (pH= 6.44-6.71**) [60].**

Selon la norme AFNOR **[8]**, le lait frais contient peu d'acide et son pH est voisin de la neutralité avec un pH compris entre 6.5-6.8 pour le lait de vache. Donc les résultats obtenus sont en grand accord avec la norme.

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraicheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraine une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH. Donc sa valeur n'est pas constante mais varie sous l'influence de plusieurs paramètres. Dans des conditions de traite traditionnelle, les variabilités sont liées au climat, au stade de lactation, à la disponibilité alimentaire, à l'apport hydrique, à l'état de santé des vaches et aux conditions de la traite.

III.1.2. Mesure d'acidité Dornic

Les résultats des mesures de l'acidité Dornic sont représentés dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Valeurs de l'acidité Dornic de lait cru

Echantillons	CH1	CH2	CH 3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10
Acidité °D	**39**	**21**	**19**	**31**	**24**	**21**	**20**	**15**	**17**	**16**
Echantillons	CH11	CH12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Acidité °D	**24**	**21**	**22**	**19**	**16**	**19**	**24**	**20**	**22**	**09**
Echantillons	F9	R1	R2	R3	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Acidité °D	**17**	**19**	**20**	**25**	**27**	**14**	**18**	**20**	**10**	**17**
Echantillons	T7	T9	T10	T11	T12	T14	T15	T16	T18	T19
Acidité °D	**14**	**16**	**14**	**18**	**16**	**23**	**19**	**17**	**17**	**15**
Moyenne	**19.37**									

L'acidité des échantillons de laits crus analysés est comprise entre 14 à 39°D avec une moyenne de 19.37°D. De plus, l'analyse du tableau III.2 montre une variabilité des résultats; 20 échantillons soit, 50% ont une acidité dépassant 18°D avec une valeur maximale de 39°D, ces acidités titrables dépassent la norme AFNOR de l'acidité du lait frais fixée entre 16-18°D **[8]**. En effet, selon Mathieu (1998), le lait de vache en début de lactation (période coïncidant avec notre étude) présente une acidité titrable de 19°D à 20°D **[61].** Cette augmentation d'acidité de titration peut être due à la dégradation du lactose en d'autres acides en plus de l'acide lactique. De plus, le pH et l'acidité dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et en ions.

Il faut noter qu'entre 18°D et 40 °D, le lait caille lorsqu'on le chauffe; c'est la caséine qui flocule. Alors qu'au-delà de 40°D, il caille à température ambiante.

L'augmentation de l'acidité du lait lorsqu'elle est involontaire est un signe de mauvaise hygiène et d'un développement intense de micro-organismes (mauvais refroidissement, mauvaise pasteurisation, durée trop longue du transport, par exemple) **[62]**.

III.1.3. Mesure de la densité

Les résultats obtenus sont représentées dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Densité de lait cru

Echantillons	CH1	CH2	CH 3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10
Densité	**1.037**	**1.014**	**1.026**	**1.028**	**1.029**	**1.028**	**1.032**	**1.027**	**1.028**	**1.035**
Echantillons	CH11	CH12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Densité	**1.031**	**1.029**	**1.028**	**1.023**	**1.036**	**1.026**	**1.026**	**1.029**	**1.010**	**1.029**
Echantillons	F9	R1	R2	R3	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Densité	**1.027**	**1.018**	**1.034**	**1.029**	**1.031**	**1.028**	**1.021**	**1.034**	**1.025**	**1.029**
Echantillons	T7	T9	T10	T11	T12	T14	T15	T16	T18	T19
Densité	**1.026**	**1.030**	**1.014**	**1.032**	**1.036**	**1.027**	**1.026**	**1.034**	**1.022**	**1.039**
Moyenne	**1.027**									

La densité du lait mesurée à la température ambiante (23°C) varie entre 1.010 et 1.039 (Voir tableau III.3) avec une moyenne de 1.027. On note que 27 échantillons soit, 67.5% ont une densité inférieure à la norme (1.030-1.032) avec une valeur minimale de 1,010.Néanmoins, Bonnefoye et *al*. (2002) considèrent que pour des valeurs situées entre 1,028 à 1,032, la densité des laits est classée normale **[8]**.La faible densité est généralement liée au phénomène de mouillage pendant la saison de basse production.

En éliminant toute possibilité du mouillage de nos laits analysés, les faibles densités obtenues peuvent être à l'origine de leurs faibles teneurs en matières sèches comme le suggère Luquet (1985) **[8]**.

III.1.4. Mesure de la matière sèche

Les résultats obtenus sont représentées dans le tableau III.4

Tableau III.4. Valeurs de l'extrait sec du lait cru

Echantillons	CH1	CH2	CH 3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10
Extrait sec (%)	**28.21**	**34.6**	**35.6**	**32.0**	**30.37**	**19.14**	**26.1**	**33.9**	**31**	**48**
Echantillons	CH11	CH12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Extrait sec (%)	**28.8**	**27.8**	**27.9**	**29.8**	**34.5**	**27.9**	**28.4**	**29.8**	**28.02**	**28.3**
Echantillons	F9	R1	R2	R3	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Extrait sec (%)	**29.82**	**30.8**	**28.3**	**31.7**	**29.9**	**29.78**	**30.14**	**28.09**	**29.20**	**28.76**
Echantillons	T7	T9	T10	T11	T12	T14	T15	T16	T18	T19
Extrait sec (%)	**26.13**	**31.98**	**33.7**	**29.88**	**31.01**	**21.6**	**28.6**	**29.20**	**28.30**	**26.4**
Moyenne	**29.84**									

Les valeurs de la matière sèche varient entre 19,14 %- 48% avec une moyenne de 29,84%. On note 62.5% des échantillons ont des valeurs de l'extrait sec inclues dans l'intervalle des normes compris entre 28.5 à 34.5% cité dans la littérature **[60]**.

Selon la littérature, la matière sèche totale peut se répartir en matière grasse, en lactose et en matières azotées protéiques **[63]**.

III.1.5. Teneur en lactose

Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g par litre **[8]**. Le lactose est le sucre caractéristique du lait, il est responsable par son goût sucré et par sa concentration élevée de la saveur douce et agréable du lait frais.

Les résultats des mesures de la teneur en lactose déterminés pour les 40 échantillons du lait cru étudiés sont regroupés dans le tableau III.5.

Tableau III.5. Teneurs en lactose du lait cru

Echantillons	CH1	CH2	CH 3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10
Lactose(g/l)	**47**	**48**	**47**	**49**	**47**	**48**	**48**	**50**	**49**	**48**
Echantillons	CH11	CH12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Lactose(g/l)	**50**	**49**	**20**	**52**	**32**	**48**	**47**	**45**	**26**	**47**
Echantillons	F9	R1	R2	R3	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Lactose(g/l)	**50**	**48**	**31**	**47**	**20**	**31**	**48**	**48**	**26**	**47**
Echantillons	T7	T9	T10	T11	T12	T14	T15	T16	T18	T19
Lactose(g/l)	**48**	**49**	**49**	**50**	**45**	**50**	**49**	**31**	**50**	**48**
Moyenne	**44.05**									

L'analyse des résultats donnés dans le tableau III.5 montre que la teneur en lactose varie entre 20 g/let 52g/l avec une moyenne de l'ordre de 44,05 g/l. On note 32 échantillons soit 80% ont des teneurs en lactose incluses dans l'intervalle des normes (40 g/l à 50 g/l) avancé par la littérature **[60]**. Pour le lait de vache, la teneur en lactose est très stable entre 48 et 50 g/l.

Le lactose subit naturellement une dégradation biochimique progressive sous l'effet des bactéries, et il se transforme en acide lactique. En conséquence, plus le pH du lait est faible et moins il est frais.

III.1.6. Test formol

Pour ce test, il faut rappeler que le résultat est basé sur le principe de changement de couleur comme le montre la figure III.1. Selon les normes, le lait doit répondre négativement au test formol. Pour ce faire, on note que :

- ✓ S'il y a persistance de la coloration jaune, le test est donc négatif et par suite le lait est accepté.
- ✓ Si la coloration change au bleue le test est donc positif et par suite le formol est présent donc le lait est refusé.

Les résultats du test de formol obtenus sont représentés dans le tableau III.6.

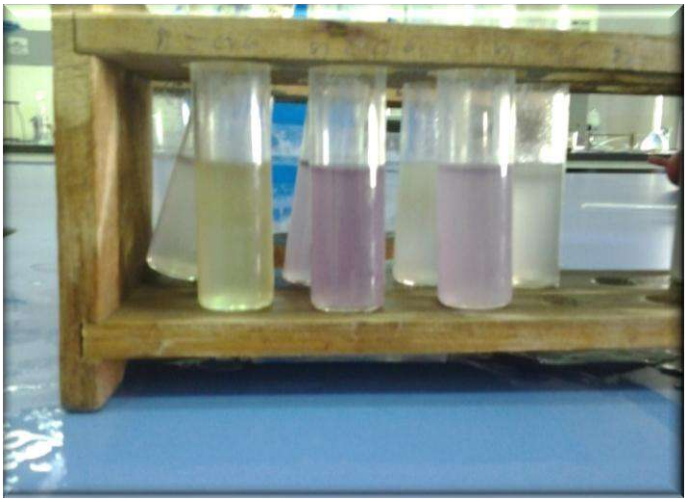


Figure III.I. Résultats du test formol

Tableau III.6. Résultats du test de formol du lait cru

Echantillons	CH1	CH2	CH 3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10
Formol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Echantillons	CH11	CH12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Formol	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Echantillons	F9	R1	R2	R3	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Formol	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Echantillons	T7	T9	T10	T11	T12	T14	T15	T16	T18	T19
Formol	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-

L'analyse des résultats regroupés dans le tableau III.6 montre que 67.5% des échantillons révèle la présence du formol justifié par l'apparition d'une couleur violette (voir figure III.1). Ces résultats nous ont permis de considérer ces échantillons du lait comme non acceptables.

La présence du formol dans le lait peut être à l'origine du transport de ce dernier de la nature à l'animal par la consommation. Selon la littérature, la consommation d'herbe fraîchement coupée traitée au formol et renfermant 490 mg/kg de formaldéhyde libre résiduel conduit à une concentration de 1,2 mg/kg de lait. De plus, l'administration à la vache laitière

d'ensilage humide et traité en vue de sa conservation, renfermant après traitement 650 mg de formaldéhyde par kilogramme de fourrage, entraîne un faible transfert dans le lait évalué à 1 % de la dose ingérée, soit 2,5 mg/kg de lait **[64]**.

III.2. Analyses bactériologiques

Les germes dénombrés sont considérés comme des indicateurs de la qualité globale des échantillons analysés et des pratiques d'hygiène. Les résultats obtenus ont permis d'évaluer les contaminations cumulées de la production jusqu'au stockage.

III.2.1. FAMT des échantillons du lait cru

La flore mésophile aérobie nous renseigne toujours sur la qualité hygiénique du lait cru, elle est considérée comme le facteur déterminant la durée de conservation du lait frais (Guinot-Thomas et *al*, 1995). C'est la flore la plus recherchée dans les analyses microbiologiques. Les valeurs obtenues pour FAMT sont représentés dans le tableau III.7.

Tableau III .7. Résultats du FAMT des échantillons du lait cru

Echantillons	CH1	CH2	CH3	CH4	CH⁶	CH6	CH7
FAMT	1,29.10⁶	2,03.10⁶	1,08.10⁷	1,91.10⁷	1,713.10⁷	1,82.10⁶	2,31 .10⁶
	Echantillons						
	CH8	CH9	CH10	CH11	CH12	F1	F2
FAMT	2,17 .10⁶	2,42.10⁶	2,74.10⁷	1,22.10⁶	2,03.10⁷	5,01.10⁶	1,20.10⁷
	Echantillons						
	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
FAMT	1,57.10⁶	4,53.10⁶	6,02.10⁶	2,18.10⁸	2,50.10⁸	2,92.10⁷	7,01.10⁷
	Echantillons						
	R1	R2	R3	T1	T2	T3	T4
FAMT	2,15.10⁷	4,32.10⁶	3,81.10⁵	1 ,413.10⁷	3,88.10⁶	1 ,045 .10⁷	1,48 .10⁷
	Echantillons						
	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
FAMT	5,04.10⁵	3,41.10⁶	1,99.10⁶	5 ,32.10⁷	2,21.10⁶	1,40.10⁶	3,41.10⁶
	Echantillons						
	T14	T15	T16	T18	T19		
FAMT	2,44.10⁷	3,09.10⁶	2,81.10⁷	1,09.10⁵	2,27.10⁵		
Moyenne	2,20.10⁷						

L'énumération de FAMT pour les 40 échantillons de lait cru a montré qu'il y a une contamination importante du lait cru analysé. En effet, nous avons relevé que 95% des

échantillons analysés, ont une flore totale qui se situe entre 1.22 10^6 et 2.5 10^8 UFC/ml. Par contre on note seulement 5% des échantillons ayant une flore totale inférieur à 10^6 UFC/ml.
Ces seuils de contaminations en flore totale dépassent la norme fixée à 10^6UFC/ml. Ils sont également supérieurs aux charges maximales tolérées par les deux réglementations française et américaine qui sont respectivement de 5.10^5 UFC/ml et 3.10^5 UFC/ml **[17]**.Ceci s'explique par un grand degré de contamination cumulé de la production à l'arrivée du lait au consommateur.

Ainsi, nos échantillons sont de mauvaise qualité au vu des normes algérienne qui fixent le seuil de contamination à 10^5 UFC/ml et ce malgré des températures de saison relativement basses au cours de la période d'étude.

Cette mauvaise qualité est purement la résultante d'une situation de négligence des plus simple règles d'hygiène dans certaines exploitations telque : le lavage du pis avant et après la traite. Aussi, la traite manuelle augmente les possibilités de contamination du lait, en accroissant la surface de contact entre le lait et les micro-organismes du milieu ambiante, surtout lorsque ce dernier est souillé.

Par ailleurs, Richard (1983), a constaté que pour des laits fortement pollués (entre 10^5 et 10^8 microorganisme/ml) la flore totale est essentiellement constituée par des streptocoques et des bactéries à Gram négatif. Ces bactéries, selon dominent habituellement dans la vaisselle laitière mal lavée **[8]**.

III.2.2. FAMT des échantillons du yaourt

Les résultats d'analyse de FAMT réalisée pour dix échantillons de yaourt sont représentés dans le tableau III.8.

Tableau III.8. Résultats de FAMT du yaourt

Echantillons	**FAMT**
Y1	$2{,}86.10^4$
Y2	$2\ ,86.10^4$
Y3	$3\ ,50.10^5$
Y4	$4{,}86.10^5$
Y5	$1{,}81.10^4$
Y6	$2\ ,70.10^4$
Y7	$2{,}11\ .10^5$
Y8	$1\ ,13.10^4$
Y9	$2\ ,32.10^4$
Y10	$2\ ,81.10^4$
Moyenne	$\mathbf{1{,}21.10^4}$

Les échantillons du yaourt examinés contiennent une charge variable de la FAMT, située entre $1{,}13.10^4$ et $4{,}86.10^5$UFC/ml avec une moyenne $1{,}21.10^4$ UFC/ml. En effet, on constate de tous les échantillons du yaourt analysés possèdent une flore totale ne dépassant pas la norme (5.10^4 UFC/ml).

Ces résultats signifiés que les échantillons du yaourt ont été fabriqués en suivant les bons pratiques de fabrication et d'hygiène. Par ailleurs, l'absence de germes peut trouver sa justification par le fait que les échantillons du yaourt ont été collectés directement après fabrication (les deux premiers jours).

III.2.3. FAMT des échantillons du beurre

Les résultats obtenus sont représentées dans le tableau III.9.

Tableau III.9. Résultats du FAMT du beurre

Echantillon de beurre	**FAMT**
B1	$3{,}29.10^5$
B2	$3{,}83.10^5$
B3	$2{,}42.10^5$
B4	$2\ ,97.10^6$
B5	$1\ ,78.10^4$
B6	$1{,}58.10^5$
B7	$2{,}42.10^5$
B8	$1{,}81.10^6$
B9	$1{,}46.10^5$
B10	$3{,}90.10^5$
Moyenne	$\mathbf{6\ ,68.10^5}$

Le dénombrement de FAMT pour les 10 échantillons du beurre de vache a montré qu'il y a également une contamination du beurre analysé. On note que 90% des échantillons analysés, ont une flore totale dépassant la norme algérienne (10^5 UFC/ml).Par contre, il y a seulement 20% des échantillons ayant une flore totale dépassant les charges maximales tolérées par les deux réglementations française et américaine qui sont respectivement de 5.10^5 UFC/ml et 3.10^5 UFC/ml.

Ces résultats montrent que l'utilisation des méthodes traditionnelles pour la fabrication du beurre de vache ainsi que le non-respect des conditions d'hygiène augmentent la possibilité de contamination de ce genre de produits.

III.3. Recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers

Il faut rappeler que nous avons procédé au dépistage des résidus d'antibiotiques dans 40 échantillons du lait cru, 10 échantillons du beurre de vache et 10 échantillons du yaourt vendus dans le marché de la wilaya de Médéa.

Pour ce faire deux méthodes ont été envisagées à savoir la méthode de diffusion sur gélose et l'HPLC.

III.3.1. Méthode de diffusion sur gélose

III.3.1.1. Contrôle de la sensibilité des souches

Il faut rappeler que nous avons procédé au premier lieu au contrôle de la sensibilité des souches choisies envers quelques antibiotiques. Les souches utilisées sont connues pour leurs sensibilités à certaines familles d'antibiotiques qui sont données dans le tableau III.10.

Tableau III.10. Familles d'antibiotiques détectées par les bactéries étudiées

Microorganisme test	**Antibiotique recherché**	**Familles**
B.subtilis	Spiramycine Streptomycine	Macrolides Aminosides
B.stéarothermophilus	Chlorotétracycline Pénicilline G	Tétracycline Pénicilline
E. coli	Amoxiciline	Bétalactamine
Staphylocoques	Oxacilline	Bétalactamine

La figure III.2 représente les résultats du contrôle de la sensibilité des souches choisies. La comparaison des diamètres des zones d'inhibition obtenus avec ceux du tableau de référence (Tableau III.11) nous a permis de juger toutes les souches sensibles à tous les antibiotiques étudiés. Donc ces souches ont été utilisées comme souches détectrices des résidus d'antibiotiques pour la suite du travail.

Tableau III.11. Références pour la lecture de l'antibiogramme **[65]**

Antibiotiques	**Souche sensible (S) si D (mm) est**	**Souche résistante (R) si D (mm) est**
Pénicilline G (béta-lactamine)	≥ 29	< 29
Oxacilline (béta-lactamine)	≥ 23	≤16
Streptomycine (aminoside)	≥15	≤13
Chlorotétracycline (tétracycline)	≥23	19-22
Spiramycine(macrolides)	≥24	≤19



Figure III.2. Résultats du contrôle de la sensibilité des souches

III.3.1.2. Test de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le lait

Après incubation, les résultats de la présence d'antibiotiques se manifestent par la formation des zones d'inhibition autour de l'échantillon testé.

Sur les 40 échantillons de lait testés avec les quatre souches de *B. stearothermophilus* et *B. subtilis*, *E. coli* et *Staphylocoques*, 9 échantillons se sont révélés positifs, soit un taux de **22,5%**.

En revanche les 31 échantillons restants ont rendu un résultat négatif pour l'ensemble des résidus d'antibiotiques recherchés, soit un taux de **77,5%**. Ces résultats sont représentés sur la figure III.3.

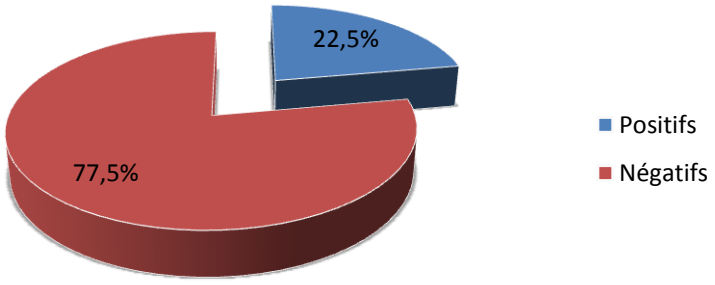


Figure III.3. Résultat globale des quarante échantillons de laits cru

Sur les 9 échantillons trouvés positifs aux résidus d'antibiotiques (voir Tableau III.12) :

1. seul un (**1**) échantillon s'est révélé positif pour les résidus de macrolides et / ou d'aminosides en induisant une inhibition circulaire de 16 mm des colonies de *B. subtilis.*
2. six (**6**) d'entre eux ont présenté une zone d'inhibition annulaire de *B. stearothermophilus* avec un diamètre maximal de 25mm. Ces échantillons ont été par conséquent considérés comme positifs pour les résidus de pénicilline et / ou de tétracycline.
3. seuls deux (**2**) échantillons se sont révélés positif pour les résidus de Bêtalactamines (oxacilline) et par l'apparition d'une zone circulaire de 18 mm des colonies de *Staphylocoques.*

Tableau III.12. Résultats positifs des échantillons de lait pour chaque bactérie

Espèce	Nombre positif
B.subtilis	1
B.stéarothermophilus	6
Staphylocoques	2
E. coli	0

Les résultats montrant les différentes zones d'inhibition obtenues pour les échantillons positifs sont regroupés dans la figure III.4

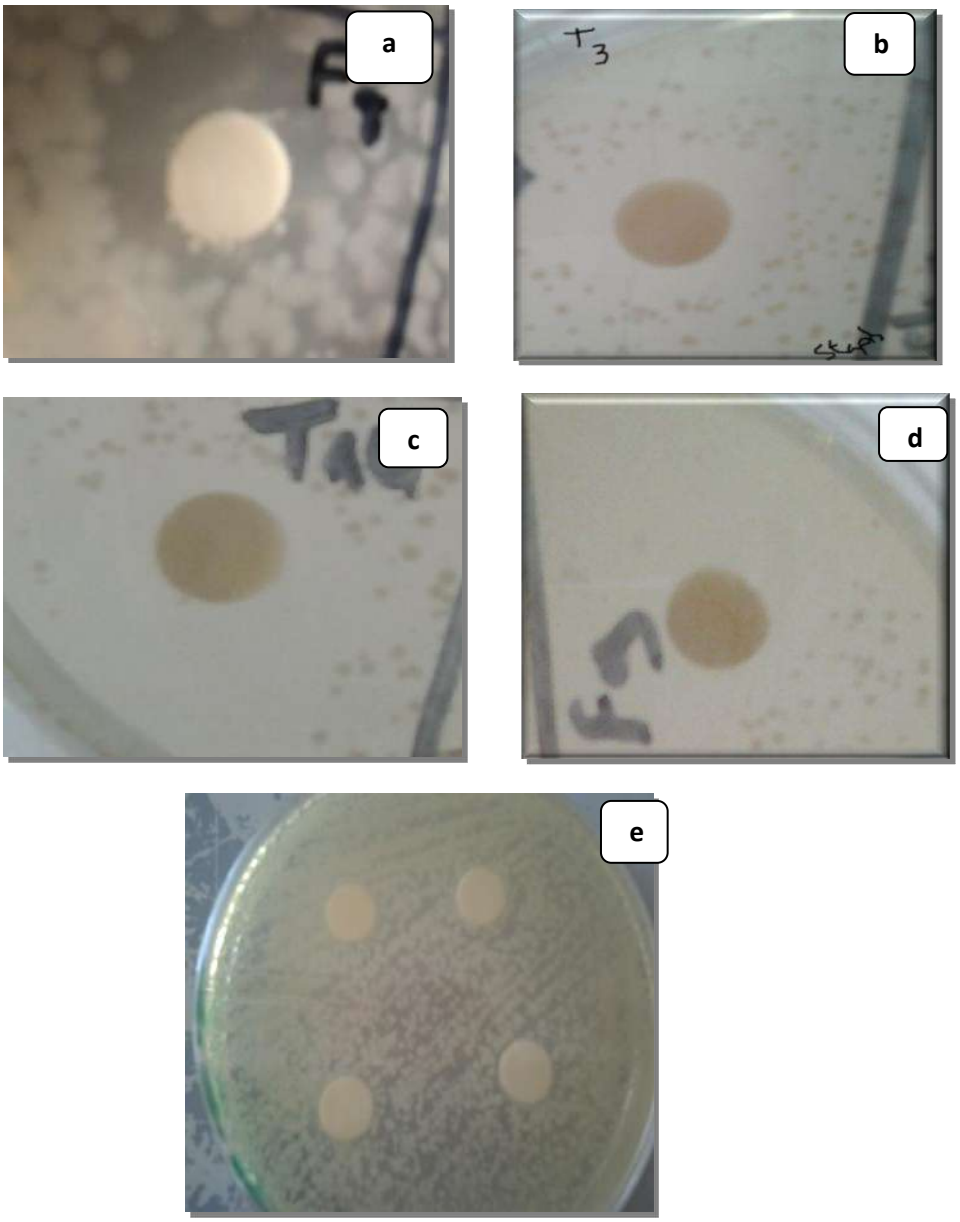


Figure III.4. Résultats des échantillons positifs du lait

a) *B.subtilis*, ***b)***Staphylocoques **c,d)** *B.stéarothermophilus*, ***e)****E. coli*

La distribution des résultats positifs selon chaque région est représentée dans le tableau III.13.

Tableau III.13. Distribution des résultats selon chaque région

Région	Echantillon positif		Echantillon négatif	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Beni Ateli (12)	1	8,33	11	91,67
Ouled Berahim (16)	6	37.5	10	62.5
Kouala (9)	2	22,22	7	77,78
Benchikaou (3)	0	0	3	100

A partir des résultats donnés dans le tableau III.13 et représentés sur la figure III.5, on peut tirer les points suivants :

- Les échantillons provenant des deux régions Ouled Brahim et Kouala sont les plus contaminés justifiés par les taux de positivité les plus élevés et qui sont de l'ordre de 37.5 % et 22.22% pour Ouled Brahim et Kouala respectivement.
- Quant aux échantillons de Beni Atela, un taux de positivité de 8.33% est enregistré contre 91.67% d'échantillons négatifs.
- Pour les échantillons provenant de Ben chikaou, un taux de négativité de 100% est enregistré.

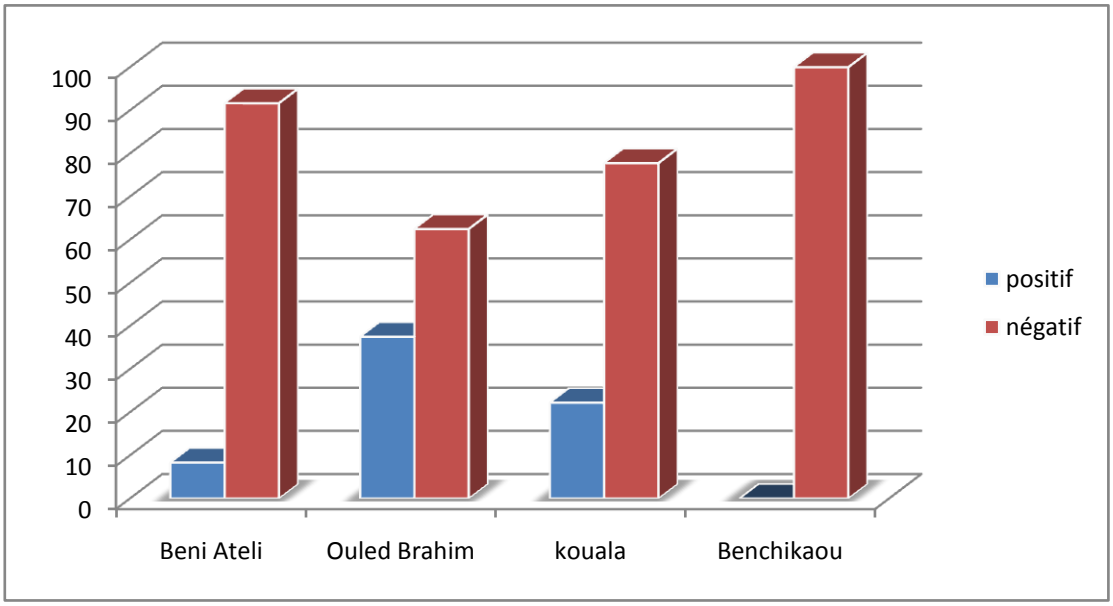


Figure III.5. Résultats des échantillons positifs et négatifs par région

III.3.1.3. Test de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le beurre de vache et le yaourt

Les résultats du test de cherche des résidus d'antibiotiques réalisé par la méthode de diffusion sur gélose dans les différents échantillons du beurre de vache ainsi que les 10 échantillons du yaourt sont représentés dans la figure III.6.

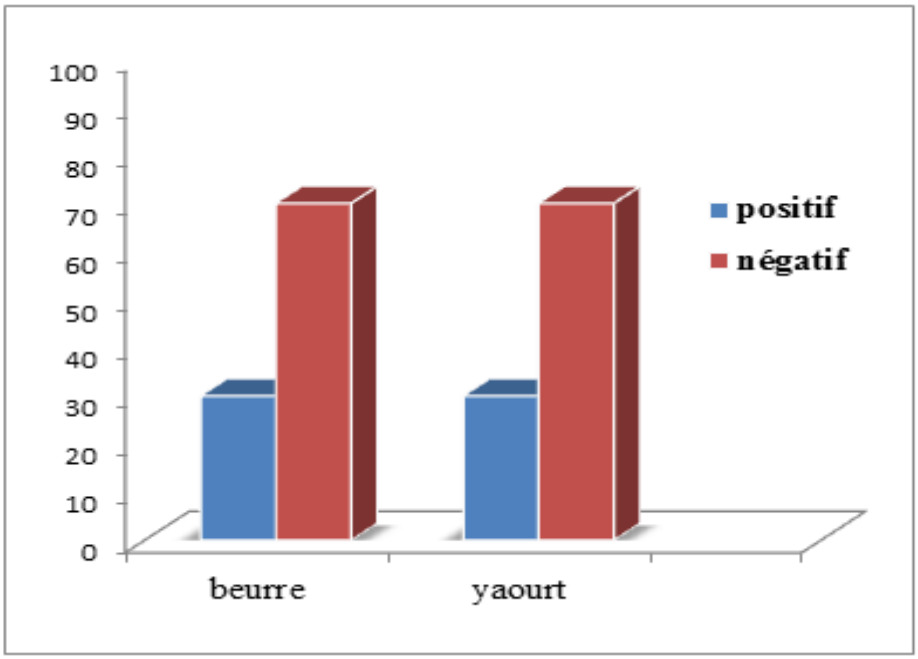


Figure III.6. Résultats des échantillons positifs et négatifs pour le beurre et le yaourt

Sur les 10 échantillons de beurre de vache testés, nous avons relevé 3 échantillons positifs, soit un taux de 30%, alors que 7 échantillons sont trouvés négatifs, soit un taux de 70%. De même pour les 10 échantillons du yaourt, nous avons enregistré 30% d'échantillons positifs contre 70% négatifs.

La figure III.7 regroupe les déférentes zones d'inhibition obtenues après incubation pour les échantillons positifs du beurre et du yaourt.

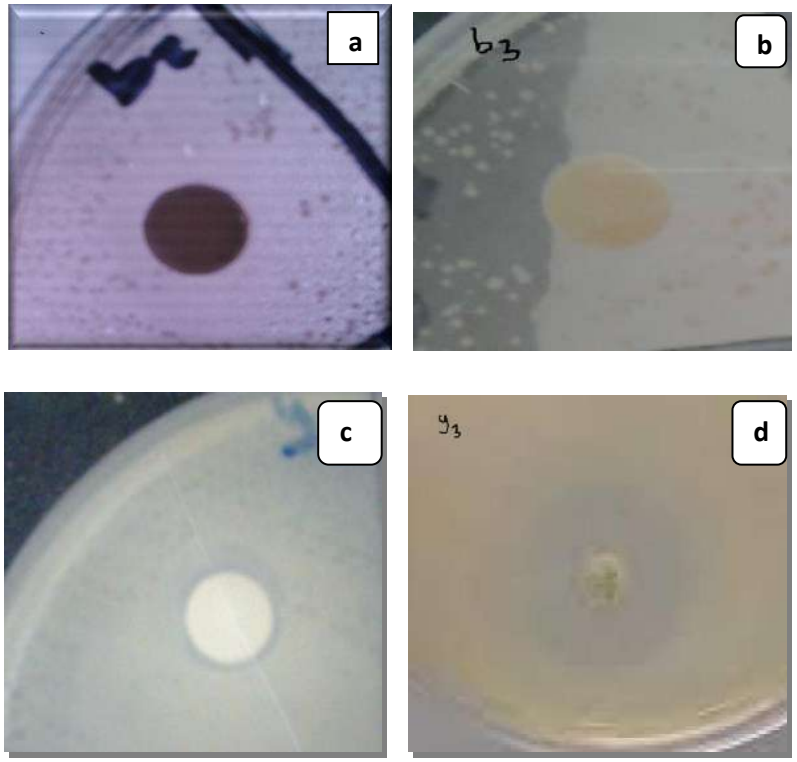


Figure III.7. Résultats des zones d'inhibitions des échantillons positifs :
a, b) Beurre, **c, d)** Yaourt

III.3.1.4. Possibilité d'identification des antibiotiques dépistés au niveau des échantillons positifs

La répartition des échantillons trouvés positifs aux différents antibiotiques est donnée dans le tableau III.14.

Tableau III.14. Répartition des échantillons de lait cru par rapport aux antibiotiques dépistés.

Familles	**Bétalactamine**	**Aminoacides**	**Tétracycline**	**Bétalactamine**
Antibiotique	Amoxicilline	Streptomycine	Chlorotétracycline	Oxacilline
	Lait			
Nombre	00	1	6	2
pourcentage	00 %	2,5%	15 %	5 %
	Beurre de vache			
Nombre	0	0	2	1
pourcentage	%	0%	20%	10%
	Yaourt			
Nombre	0	0	0	3
pourcentage	0%	0%	0%	30%

L'analyse des résultats du tableau III.14 montre que :

1- Sur les 40 échantillons du lait cru étudiés, 9 échantillons se sont trouvés positifs. Ces derniers sont répartis comme suit:

- Aucun échantillon contaminé par les résidus de l'antibiotique d'amoxicilline.
- 1 échantillon est contaminé par les résidus de l'antibiotique Streptomycine, soit un aussi un pourcentage de 2,5%.
- 6 échantillons sont contaminés par les résidus de l'antibiotique chlorotétracycline, soit un pourcentage de 15%.
- 2 échantillons sont contaminés par les résidus de l'antibiotique oxacilline, soit un pourcentage de 5%.

2- Sur les 10 échantillons du beurre étudiés, 3 échantillons se sont trouvé positifs. Ces derniers sont répartis comme suit:

- 2 échantillons de beurre sont probablement contaminés par les résidus de l'antibiotique chlorotétracycline avec pourcentage de 20%.
- 1 échantillon de beurre est probablement contaminé par les résidus de l'antibiotique oxacilline, soit un pourcentage de 10%
- Aucun échantillon n'est contaminé par les résidus de l'antibiotique d'amoxicilline et streptomycine.

3- Sur les 10 échantillons du yaourt analysés, 3 échantillons se sont trouvé positifs. Ces derniers sont répartis comme suit:

- 3 échantillons du yaourt sont probablement contaminés par les résidus de l'antibiotique oxacilline, soit un taux de 30%.
- Aucun échantillon n'est contaminé avec les résidus des antibiotiques suivants : tétracycline, chlorotétracycline et streptomycine.

III.3.1.5. Conclusion

La positivité enregistrés pour les échantillons du lait cru analysés peut être probablement due aux facteurs suivants :

- Eleveurs qui ne connaissent pas ou ne respectent pas les règles d'utilisation des antibiotiques chez les animaux.
- Administration par voie galactophore d'un ou de plusieurs antibiotiques; ces traitements représentent la première cause de résidus d'antibiotique dans le lait.
- Usage massif et incontrôlé des préparations pharmaceutiques intra-mammaires pour le traitement et la prévention des mammites bovines, qui représentent également un des principales causes de contamination du lait par des résidus d'antibiotiques.
- Le non-respect de délai d'attente.

De plus il faut signaler qu'un taux élevé de lait négatifs (77.5%), n'est pas obligatoirement synonyme de salubrité car souvent nous pouvons être confronté à des laits qui continent des résidus d'antibiotiques, mais à des concentrations inférieurs au seuil de détection du test déterminé par la limite maximum de résidus, ou des laits qui contiennent des résidus d'antibiotiques qui ne s'expriment pas au test ; donnant lieu à des résultats faussement négatifs comme les polypeptides et le chloramphénicol ; bien que ce dernier est interdite chez les animaux de rente .

III.3.2. Méthode de confirmation par HPLC

Il faut rappeler que pour ce test, nous avons choisis seulement 8 échantillons du lait cru à partir des différentes régions étudiées : CH3, CH8, F1, F8, T5, T11, R1 et R3.

L'utilisation de la méthode d'HPLC pour le dépistage des résidus d'antibiotiques a confirmé les résultats obtenus par la méthode microbiologique. La positivité de l'échantillon testé se traduit par l'obtention des pics convenables indiquant la présence d'antibiotique.

L'analyse par HPLC est basée sur l'utilisation des échantillons témoins. Les chromatogrammes obtenus pour les 3 antibiotiques témoins utilisés dans cette présente étude sont regroupés dans la figure III.7.

Les données correspondantes aux chromatogrammes obtenus sont enregistrées dans le tableau III.15.

Tableau III.15. Données des chromatogrammes des antibiotiques témoins

Graphes	Nom	Nombre des Pics	Temps de rétention (mn)	Surface
A	Oxacilline	1	7,950	8588217
B	Chlorotétracycline	1	3,367	1951432
		2	6,400	2142864
C	Pénicilline G	1	4,63	2440244

L'analyse des chromatogrammes obtenus permet de tirer les points suivants :

- Le chromatogramme d'oxacilline est caractérisé par un seul pic avec un temps de rétention de 7.950 mn ;
- Le chromatogramme de la chlorotétracycline est caractérisé par l'apparition de deux pics avec des pics de rétention de 3.367 mn et 6.4 mn.
- Le chromatogramme de la pénicilline G est aussi caractérisé par l'apparition d'un seul pic avec un temps de rétention de 4.63 mn.

Ces données sont de grandes importances pour l'identification des pics des chromatogrammes des échantillons du lait testés.

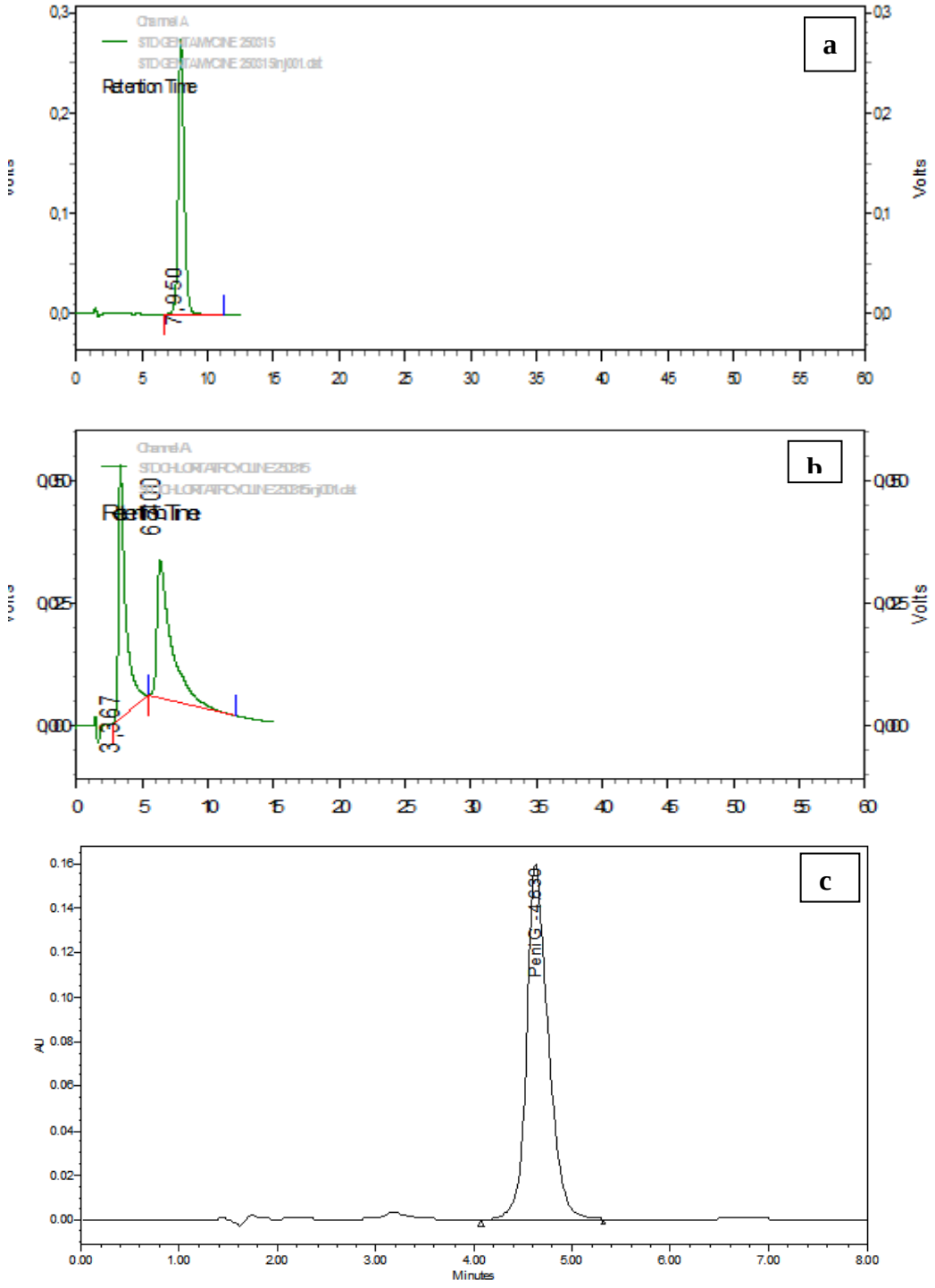


Figure III.8. Résultats du Chromatographie des standards des antibiotiques utilisés

L'analyse des chromatogrammes (Figure III.8) obtenus pour les différents échantillons du lait testés nous a permet de tirer les données regroupées dans le tableau III.16.

Tableau III.16. Données des chromatogrammes des échantillons du lait testés

Echantillon	Nombre de pics	Temps de rétention (mn)	Surface
F1	1	1,458	1090178
	2	3,142	134386
F8	1	1,460	956341
	2	3,160	105480
Ch3	1	1,449	906559
	2	3,169	84605
Ch8	1	1,454	1127259
	2	3,144	136161
T5	1	1,569	905069
	2	3,165	88291
T11	1	1 ,617	1471884
	2	3,166	78955
R3	1	1 ,460	883283
	2	3,155	118514
R1	1	1,470	678830
	2	3,163	92602

L'analyse des chromatogrammes représentés sur la figure III.9 ainsi que les données enregistrées dans le tableau III.16 montre que tous les chromatogrammes possèdent deux pics : un grand élué en premier avec un temps de rétention compris entre 1.449 et 1.617 et deuxième pic plus petit que le premier caractérisé par un temps de rétention variant entre 3.142 et 3.169.

La comparaison du premier pic de tous les échantillons du lait avec les pics des antibiotiques témoins en termes de surface et de temps de rétention nous a permis de dire qu'aucune des données du premier pic ne corresponde à celles des antibiotiques témoins. Ceci nous a conduits de penser que le premier pic de tous les échantillons du lait testés peut être attribué à l'éluant (acétonitrile + eau).

Quant au deuxième pic, nous avons remarqué que son temps de rétention est proche de celui du premier pic du témoin chlorotétracycline (T_R = 3,367 mn). Ce qui nous permet de confirmer la présence des résidus de chlorotétracycline dans les échantillons du lait testés.

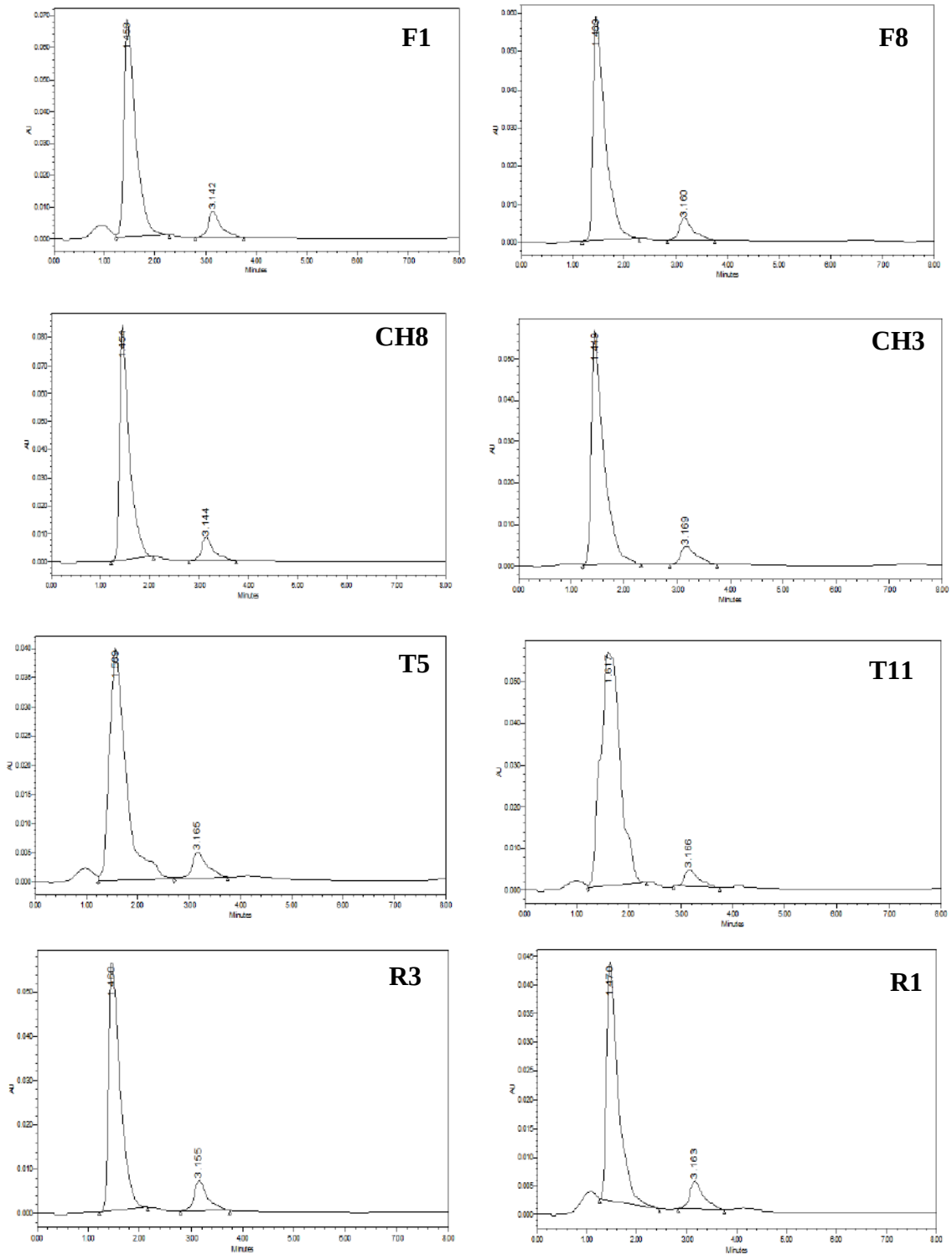


Figure III.9. Chromatogrammes des échantillons du lait testés.

Conclusion générale

Les antibiotiques sont utilisés couramment en agriculture et en médecine vétérinaire depuis les années 1950. Leurs utilisations inappropriées, laissent des résidus soit dans les tissus, soit dans les produits laitiers. Ces résidus ont des effets toxiques directs sur les consommateurs, par exemple, des réactions allergiques chez les personnes hypersensibles, ou indirectement et peut même causer des problèmes par le biais de l'induction de souches résistantes de bactéries.

La recherche systématique des résidus d'antibiotiques dans les échantillons de lait demeure le seul moyen de prévention qui peut assurer l'innocuité complète de ce produit. Pour ce faire, il est donc impératif de disposer de méthodes de détection fiables, sensibles et spécifiques. Une évaluation de la qualité hygiénique du lait permet de rechercher la microflore naturelle et des microorganismes témoins de contaminations extra-mammaires éventuelles.

L'objectif principal de ce présent travail est l'utilisation des méthodes microbiologiques pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans le lait cru.

Dans un contexte général d'analyse des laits crus, nous nous sommes intéressés lors de cette étude à la caractérisation physicochimique de 40 échantillons de lait cru provenant de quatre régions de la wilaya de Médéa : Beni Ateli, Ouled Brahim, Kouala et Ben chikaou. Les résultats obtenus révèlent que les différents échantillons des lais testés contiennent un peu d'acide et leur pH est voisin de la neutralité (6.88). De plus, 80% des échantillons sont riches en lactose avec des teneurs comprises entre 40 g/l et 50 g/l.

D'une autre part, le dénombrement de FAMT pour les 40 échantillons de lait cru a montré qu'il y a une contamination flagrante des laits crus analysés. En effet, 95% des échantillons analysés, ont une flore totale dépassant la norme fixée à 10^6 UFC/ml (entre 1.22 10^6 et 2.5 10^8 UFC/ml). Quant aux échantillons des produits laitiers testés, un taux de contamination de 20% est enregistré pour les 10 échantillons de beurre de vache testés, alors que tous les 10 échantillons du yaourt analysés possèdent une flore totale en accord à la norme de $5 .10^4$ UFC/ml.

La méthode microbiologique d'analyse mise en œuvre (diffusion sur gélose) pour la recherche des résidus d'antibiotique et utilisant quatre souches (*B.Stearothermophilus, B. subtilis, E.Coli* et *staphylococcus)* comme micro-organismes test, a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Un taux de positivité de l'ordre de 22.5% est estimé pour les échantillons de lait.
- 2,5% de ces échantillons positifs sont contaminé par les résidus de streptomycine, contre un pourcentage de 15 % enregistré pour les échantillons contaminés par le chlorotétracycline et 5 % des échantillons contaminés par les résidus d'oxacilline.
- 30% des échantillons de beurre ont été avérés positifs dont 20% sont attribués aux résidus de chlorotétracycline et 10% aux résidus d'oxacilline.
- 30% des échantillons de yaourt sont contaminés par les résidus d'oxacilline.

L'épreuve de confirmation avec la méthode analytique HPLC a révélé que tous les échantillons des laits choisis sont positifs aux chlorotétracycline.

En fin, il faut signaler que ce travail est loin d'être achevé, et, il serait intéressant de poursuivre cette recherche en utilisant d'autres moyens de dépistage comme les kits rapides de détection : Delvotest®, Copan test……ainsi que la vrai utilisation de la méthode analytique HPLC.

Sommaire

Introduction générale ……..1

I.1.Le lait ……..……3

I.1.1.Définition ……..……...3

I.1.2. Composition du lait……..……3

I.1.2.1.L'eau ……..……...3

I.1.2.2. Matière grasse……..4

I.1.2.3. Matière azotée…….…….5

I.1.2.4. Glucides ……..6

I.1.2.5. Matière minérale……..7

I.1.2.6. Biocatalyseurs…….. 7

I.1.2.6.1. Enzymes……7

I.1.2.6.2.Vitamines……8

I.1.3. Caractéristiques physicochimique du lait……...……. 8

I.1.4. Microbiologie du lait cru……..9

I.1.4.1. Flore originelle……..……...……10

I.1.4.2. Flore de contamination…….……10

I.1.4.3. Flore psychrotrophe ……..……..13

I.1.5. Valeur nutritive du lait……...……..13

I.1.5.1. Apport en protéines…….……...13

I.1.5.2. Apport en lipides……..13

I.1.5.3. Apport en glucides…….……...14

I.1.5.4. Apports en minéraux et oligo-éléments……14

I.1.5.5. Apports en vitamines ……14

I.1.6. Importance de la consommation du lait……..14

I.1.7. Importance de la consommation du lait dans le monde…….…15

I.1.8. Importance de la consommation laitière en Algérie……..……16

I.2. Résidus d'antibiotique dans le lait……16

I.2.1. Définition des résidus d'antibiotiques……16

I.2.2. Origine des résidus……17

I.2.2.1. Utilisation des antibiotiques à titre curatif ou préventif……17

I.2.2.2. Utilisation des antibiotiques comme des additifs alimentaires……..17

I.2.2.3.Utilisation en métaphylaxie……18

I.2.3. Nature des résidus……18
I.2.3.1. Résidus extractibles……18
I.2.3.2. Résidus non-extractibles……18
I.2.4. Propriétés des résidus……..18
I.2.4.1. Notion de biodisponibilités et biodisponibilités de relais……18
I.2.4.2. Notion de toxicodisponibilité……..19
I.2.5. Problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques ……19
I.2.5.1. Problèmes sanitaires……19
I.2.5.1.1. Problèmes d'allergie……..19
I.2.5.1.2. Risques toxiques……20
I.2.5.1.3. Modification de la flore digestive du consommateur…….20
I.2.5.1.4. Risque d'antibioresistances……20
I.2.5.2. Problèmes technologiques……21
I.2.6. Règlementation autour des résidus d'antibiotiques……..21
I.2.6.1. Définition de LMR……..22
I.2.6.2. Principes généraux des LMR ……22
I.2.6.3. Etablissement des LMR ……22
I.2.6.4.Législation algérienne……..24
I.2.6.5. Délai d'attente……25
I.2.6.5.1.Définition ……25
I.2.6.5.2. Lien entre le temps d'attente et La limite maximale des Résidus……25
I.2.6.5.3. Méthode de calcul de temps d'attente dans le lait ……25
I.2.7. Méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques ……..26
I.2.7.1. Historique et évolution des méthodes de détection dans le temps 26
I.2.7.2. Tests de dépistage des résidus d'antibiotiques……27
I.2.7.3. Méthode d'acidification ……28
I.2.7.4. Delvotest……29
I.2.7.5. Premi® test……29
I.2.7.6.Méthode Star ou méthode des 5 boites……29
I.2.7.7. Méthodes de confirmation……30
A.1 . HPLC ……31
A.2. Chromatographie sur couche mince……32
II. Matériels et méthodes

II.1. Introduction ……..34
II.2. Matériel et produits……34
II.3. Localisation et conditions de prélèvement du lait et des produits laitiers…..36
II.4. Analyses physicochimiques du lait cru……...37
II.4.1. Mesure de pH……..……..……..37
II.4.2. Détermination de la densité……..……..38
II.4.3. Détermination de la teneur en lactose……..……..39
II.4.3.1. Principe……..……39
II.4.3.2. Mode opératoire……..……...40
II.4.4.Détermination de la matière sèche……..……..……41
II.4.4.1. Mode opératoire ……..……..……..……41
II.4.5. Détermination de l'acidité titrable en Dornic……..…..……42
II.4.6. Test de formol……..……..……42
II.5. Analyses microbiologiques……..……..……43
II.5.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile total (FAMT)dans le lait et les produits laitiers ……..……43
II.6. Recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru et les produits laitiers ..45
II.6.1. Méthode de diffusion sur gélose……...……46
II.6.1.1. Principe de la diffusion sur gélose……46
II.6.1.2. Mode opératoire……..47
II.6.2. Méthode analytique : HPLC……..……50
II.6.2.1. Principe ……..……50
II.6.2.2. Mode opératoire……...……50

III. Résultats et disscussion

III.1.Analyses physicochimiques du lait cru……...……53
III.1.1. Mesure du pH……..……..53
III.1.2. Mesure d'acidité Dornic……..……..……54
III.1.3. Mesure de la densité ……54
III.1.4. Mesure de la matière sèche……..……55
III.1.5. Teneur en lactose……56
III.1.6. Test formol……..57
III.2. Analyses bactériologiques……..……58

III.2.1. FAMT des échantillons du lait cru……58
III.2.2. FAMT des échantillons du yaourt……60
III.2.3. FAMT des échantillons du beurre……..61
III.3. Recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers …….61
III.3.1. Méthode de diffusion sur gélose……62
III.3.1.1. Contrôle de la sensibilité des souches…….62
III.3.1.2. Test de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le lait…..63
III.3.1.3. Test de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le beurre de vache et le yaourt…….……67
III.3.1.4. Possibilité d'identification des antibiotiques dépistés au niveau des échantillons positifs……..68
III.3.1.5. Conclusion…….…….70
III.3.2. Méthode de confirmation par HPLC……..71
Conclusion générale ……...76